



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

CONSTRUÇÃO GÊNICA, PROCESSO PARA MODULAR A RESPOSTA OXIDATIVA EM ARROZ, PROCESSO PARA MODULAR A TOLERÂNCIA DE PLANTAS AO ALUMÍNIO

5

Campo da Invenção

A presente invenção está no campo de Biotecnologia e Biologia Molecular. Mais especificamente, a presente invenção proporciona: construções gênicas; processos para modular resposta oxidativa em arroz; e
10 processos para modular a tolerância de plantas ao alumínio. Os objetos da invenção têm como conceito inventivo comum o uso de APX citosólicas (*OsAPx1* e *OsAPx2*) e peroxissomais (*OsAPx3* e *OsAPx4*) de arroz.

Antecedentes da Invenção

15 Organismos aeróbicos, em um mecanismo eficiente de obtenção de energia, utilizam o oxigênio atmosférico (O_2) para oxidar componentes orgânicos. A redução univalente da molécula de O_2 produz um conjunto de formas parcialmente reduzidas de oxigênio, denominadas de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). Desta forma, a produção de ERO é inevitável em
20 condições ótimas de crescimento. A imposição de condição de estresse biótica ou abiótica conduz à elevação da produção destas moléculas. O acúmulo das ERO, causado pelo aumento de sua produção e ineficiência dos mecanismos antioxidantes em decomporem estas moléculas em formas menos tóxicas, pode resultar em diversos danos oxidativos em nível celular (SHIGEOKA *et al.*,
25 2002).

A disponibilidade das seqüências completas de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) e de arroz (*Oryza sativa*) e os avanços nas pesquisas, como em genômica funcional e proteômica, têm permitido melhor entendimento da função das ERO, referente ao seu papel na toxicidade celular e como molécula

sinalizadora de diversos mecanismos celulares, entre esses, defesa a estresses bióticos e abióticos.

Espécies Reativas de Oxigênio

5 Espécies Reativas de Oxigênio são formas parcialmente reduzidas de oxigênio atmosférico. São formadas a partir da excitação do O_2 que resulta na forma de oxigênio singlete (1O_2) ou pela transferência de um, dois ou três elétrons para o O_2 formando, respectivamente, radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou radical hidroxila (HO^*) (MITTLER, 2002).

10 As ERO são produtos secundários inevitáveis do metabolismo aeróbico (KOTCHONI & GACHOMO, 2006). Reações formadoras de ERO estão envolvidas com o metabolismo normal, como na fotossíntese e respiração, assim como pertencem a vias induzidas durante estresses abióticos (MITTLER, 2002). As ERO podem ser geradas por diversas atividades enzimáticas, por exemplo, pela atividade das NADPH oxidases (MITTLER *et al.*, 2004). Durante 15 condições normais de crescimento, a produção de ERO é baixa ($240\mu M s^{-1} O_2^-$ e $0,5\mu M H_2O_2$ em cloroplastos). Entretanto, diante de diversos tipos de estresse, quando a homeostase celular é rompida, ocorre aumento da produção destas espécies ($240-720\mu M s^{-1} O_2^-$ e $5-15\mu M H_2O_2$ em cloroplastos) (POLLE, 2001; MITTLER, 2002).

20 Organelas com alta atividade metabólica oxidativa ou com intenso fluxo de elétrons, como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomo, são a maior fonte de produção de ERO nas células vegetais. O H_2O_2 , além de ser produzido durante a fotossíntese, fotorrespiração e respiração, também é gerado na matriz extracelular. O citosol não é considerado grande fonte de ERO, mas 25 atua como um depósito para estas moléculas derivadas de outros compartimentos subcelulares (SLEVAK *et al.*, 2007).

O peróxido de hidrogênio é a molécula mais estável entre as ERO e apresenta papel crucial como molécula sinalizadora em vários processos fisiológicos. Níveis intracelulares e intercelulares de H_2O_2 elevam-se em 30 estresses ambientais. O H_2O_2 é o fator chave na mediação do fenômeno de aclimatização e tolerância cruzada, através do qual uma exposição prévia a um

estresse pode induzir tolerância as subseqüentes exposições ao mesmo ou outro estresse (SATO *et al.*, 2001; NEILL *et al.*, 2002). H₂O₂ interage com proteínas contendo o grupo funcional tiol e ativa diferentes vias de sinalização, assim como, fatores de transcrição. O H₂O₂ é transportado pelas membranas
5 juntamente com água pelos canais de água aquaporina (HENZLER & STEUDLE, 2000). Conseqüentemente, H₂O₂ é capaz de regular expressão gênica e processos do ciclo celular (SLESÁK *et al.*, 2007).

Defesa versus morte celular

As ERO, além de indicadores celulares de estresse, são mensageiros
10 secundários envolvidos em vias de transdução de sinal de resposta a estresses. A concentração intracelular de ERO deve ser controlada finamente, pois o acúmulo destas espécies pode resultar em morte celular (MITTLER, 2002). Seu duplo papel nas reações metabólicas, atuando como produto secundário tóxico do metabolismo aeróbico e como regulador chave de
15 crescimento, desenvolvimento e vias de defesa, é dependente da sua concentração intracelular (FOYER & NOCTOR, 2005; KOTCHONI & GACHOMO, 2006). Uma questão pertinente é como as ERO, principalmente H₂O₂, são capazes de atuar especificamente, apesar do duplo papel funcional e das diversas respostas biológicas que participam (Figura 1).

20 As ERO, como moléculas sinalizadoras, controlam diversos processos metabólicos: ciclo celular, crescimento, morte programada da célula, senescência, sinalização hormonal, resposta a estresses abióticos, defesa a patógenos, respostas sistêmicas e desenvolvimento (MITTLER *et al.*, 1998; MITTLER, 2002; VRANOVÁ *et al.*, 2002; VANDENABEELE *et al.*, 2003;
25 VACCA *et al.*, 2004; DE PINTO *et al.*, 2006; KWAK *et al.*, 2006; TORRES *et al.*, 2006; QUEVAL *et al.*, 2007; SLESÁK *et al.*, 2007; ZAVALETA-MANCERA *et al.*, 2007). Uma alteração sutil na homeostasia de ERO conduz a uma modificação da regulação da expressão de um conjunto específico de genes, como a alteração na expressão de genes codificantes de proteínas
30 antioxidantes e de proteínas envolvidas na cascata de fosforilação, via ativação de MAPK (KOVTON *et al.*, 2000; NEILL *et al.*, 2002; KOTCHONI & GACHOMO,

2006). Diferentes tipos de ERO afetam a expressão gênica nuclear ativando distintas vias de sinalização. Estresses que induzem a formação de $^1\text{O}_2$ afetam aproximadamente 5% do total do genoma de *Arabidopsis*, entretanto a expressão destes genes não é afetada da mesma forma quando ocorre elevação dos níveis de $\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$. Não se sabe até o momento se estas vias operam separadamente ou interagem entre si. Inclusive, parece existir antagonismo entre H_2O_2 e $^1\text{O}_2$ no que se refere às respostas a estresses abióticos. Uma interação cruzada entre as ERO parece ser essencial para o controle fino dos ajustes antioxidantes quando em situação de estresse (LALOI *et al.*, 2007).

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

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

Mecanismos de defesa antioxidante na célula vegetal

Uma vez que as ERO são tóxicas e também participam de eventos de sinalização, as células vegetais requerem mecanismos que regulem finamente a concentração intracelular destas moléculas (MITTLER, 2002; MITTLER *et al.*, 5 2004; NEILL *et al.*, 2002; KOTCHONI & GACHOMO, 2006). A localização subcelular e as propriedades bioquímicas distintas das enzimas antioxidantes, suas induções diferenciais em níveis gênico e enzimático e a presença de mecanismos não-enzimáticos resulta em um sistema antioxidante versátil e flexível capaz de controlar o acúmulo de ERO (VRANOVÁ *et al.*, 2002). A 10 concentração é determinada pela diferença entre os mecanismos de produção e decomposição das ERO. Estes mecanismos podem ser alterados bruscamente dependendo da condição fisiológica na qual a planta se encontra e da integração dos estímulos bioquímicos, do desenvolvimento e do ambiente (MITTLER, 2002).

15 A redução da produção de ERO pode evitar ou aliviar os efeitos do estresse. Mecanismos que podem reduzir esta produção durante situações de estresse são: (1) adaptação anatômica, como movimento e curvatura foliar; (2) adaptações fisiológicas, como metabolismo C4 e CAM ("Crassulacean acid metabolism"); (3) mecanismos moleculares que regulam o aparato 20 fotossintético de acordo com a intensidade e qualidade da luz (MITTLER, 2002).

Em condições normais de crescimento, ERO são rapidamente metabolizadas por vias antioxidantes enzimáticas e por metabólitos não-enzimáticos de baixo peso molecular, como vitaminas antioxidantes, tióis 25 protéicos e não-protéicos (Lim *et al.*, 1993; KOTCHONI & GACHOMO, 2006). Elementos antioxidantes não-enzimáticos, como ascorbato (AsA) e glutatona (GSH), são cruciais na defesa contra estresse oxidativo, exercendo papel de tampões antioxidantes (MITTLER, 2002; FOYER & NOCTOR, 2005). O pool celular de ascorbato e glutatona é mantido no seu estado reduzido por um 30 conjunto de enzimas dependentes de NAD(P)H (monodehidroascorbato

redutase, dehidroascorbato redutase e glutathiona redutase) (MITTLER *et al.*, 2004).

Os principais mecanismos enzimáticos de decomposição de ERO em células vegetais incluem superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathiona peroxidase (GPX), peroxirredoxina (PrxR) e catalase (CAT). Estas enzimas antioxidantes estão presentes em praticamente todos os compartimentos subcelulares. Usualmente, uma organela apresenta mais de uma enzima que decompõem uma mesma ERO (MITTLER, 2002; MITTLER *et al.*, 2004). É importante destacar que o H_2O_2 apresenta a capacidade de difusão entre os diferentes compartimentos subcelulares (HENZLER & STEUDLE, 2000). Além disso, o transporte de ascorbato e glutathiona é central na determinação da concentração específica destes compostos e do potencial redox nos diferentes compartimentos celulares (PIGNOCCHI & FOYER, 2003; MITTLER *et al.*, 2004).

O balanço entre as atividades de SOD, APX e CAT é crítico para determinar o nível intracelular do radical superóxido e de peróxido de hidrogênio (MITTLER, 2002). Este balanço e o sequestro de íons metálicos são importantes para prevenir a formação de radicais hidroxila via reações de Fenton (ASADA, 2006). APX e CAT utilizam como substrato H_2O_2 . A diferença de afinidade pelo H_2O_2 de APX (em nível de μM) e de CAT (em nível de mM) sugere funções diferentes entre as duas enzimas: APX parece ser responsável pela modulação fina de ERO, enquanto a CAT deve exercer papel na remoção de H_2O_2 durante estresse. Outra diferença entre APX e CAT é a localização subcelular. Catalase encontra-se preferencialmente no peroxissomo. Além disso, diferentemente de APX, a atividade de CAT não requer suprimento de moléculas doadoras de elétrons (MITTLER, 2002).

O ciclo da ascorbato-glutathiona é essencial na decomposição de H_2O_2 . Os componentes deste ciclo antioxidante estão presentes em praticamente todos os compartimentos intracelulares (Figura 2). A APX utiliza ascorbato (AsA) na sua forma reduzida como doador específico de elétron para reduzir H_2O_2 em água com concomitante geração de monodehidroascorbato (MDAsA).

MDAsA pode ser espontaneamente reduzido a AsA e dehidroascorbato (DAsA). AsA ainda pode ser recuperado pela ação da MDAsA redutase dependente de NAD(P)H. DAsA redutase, utilizando GSH como doador de elétrons, reduz DAsA à ascorbato. A forma reduzida de glutathione é, por sua vez, recuperada a partir de sua forma oxidada (GSSG) pela GSH redutase dependente de NAD(P)H (ASADA, 1999; SHIGEOKA *et al.*, 2002).

O Modelo Vegetal

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

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

Seqüências expressas do arroz têm sido ativamente identificadas. Mais de 1,1 milhão de "expressed sequence tags" (EST) e seqüências completas de DNA complementar (FL-cDNA) foram depositadas em bancos de dados (dado divulgado por C. ROBIN BUELL no "Plant Genome Annotation Workshop" em maio de 2007). Essas seqüências transcritas derivam de diversos tecidos, diferentes épocas de desenvolvimento e estresses bióticos e abióticos aos

quais a planta é submetida. A presença destas seqüências têm conduzido à identificação e à descoberta de novos e importantes genes vegetais.

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

Foram desenvolvidas várias ferramentas que reforçam o papel do arroz como uma planta modelo: i) mapa genético saturado (Internacional Rice Genome Sequencing Project, 2005; HARUSHIMA *et al.*, 1998) e, ii) técnica eficiente de transformação genética (HIEI *et al.*, 1994). Além disso, mapas genéticos comparativos entre a família de gramíneas revelou regiões extensas de conteúdo gênico conservado e ordenado, ou seja, a existência de intensa sintenia entre as gramíneas (MOORE *et al.*, 1995). Desta forma, a identificação e o estudo de genes de arroz podem fornecer informações válidas na investigação de características e regiões genômicas entre as gramíneas, o que pode resultar em melhoramento em nível agrônômico destas espécies (BENNETZEN, 2002). Desta forma, o arroz é um organismo ímpar para o estudo da fisiologia, biologia do desenvolvimento, genética e evolução de plantas.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

É um dos objetos da presente invenção proporcionar construções gênicas úteis para a modulação da resposta oxidativa em arroz.

É um outro dos objetos da presente invenção proporcionar construções gênicas úteis para a modulação da tolerância de plantas ao alumínio.

É um outro dos objetos da presente invenção proporcionar processos para modular da resposta oxidativa em arroz.

5 É um outro dos objetos da presente invenção proporcionar processos para modular a tolerância de plantas ao alumínio.

Em um aspecto, os objetos da invenção têm como conceito inventivo comum a modulação, em plantas, da expressão de genes codificadores de APX. Em uma concretização preferencial, a referida modulação se dá por meio do silenciamento pós-transcricional por RNA de interferência (RNAi) de genes
10 individuais e de ambos os genes codificantes de APX de mesma localização subcelular.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão
15 descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

A figura 1 mostra o ciclo ascorbato-glutationa e reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes SOD e CAT.

20 A figura 2 mostra a confirmação da transformação de *Escherichia coli* com vetor pANDA-OsAPX2s. Resultado do PCR com primers desenhados para construção "hairpin" visando o silenciamento de OsAPX2 (225pb). Foi utilizado como controle positivo alíquota do vetor pANDA recombinado com construção OsAPX2s. Como controle negativo foi utilizada água. As amostras amplificadas
25 são derivadas de 2 colônias isoladas de *Escherichia coli* transformadas e crescidas em meio de cultura contendo canamicina.

A figura 3 mostra a confirmação da transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com vetor pANDA-OsAPx4s. Resultado do PCR com primers desenhados para construção "hairpin" visando o silenciamento de OsAPx4
30 (245pb). Foi utilizado como controle positivo alíquota de vetor pANDA recombinado com construção OsAPx4s. Como controle negativo foi utilizada

água. As amostras amplificadas são derivadas de 2 colônias isoladas de *A. tumefaciens* transformadas e crescidas em meio de cultura contendo rifampicina e canamicina.

A figura 4 mostra a transformação de calos de arroz *Oryza sativa* L. subespécie *japonica* cultivar Nipponbare por *Agrobacterium tumefaciens* AGL1/RNAi. 4.1) Co-cultivo de calos de arroz com *A. tumefaciens* transformada com o vetor pANDA – *OsAPx1/2s*. 4.2) Calos transformação em meio de cultura contendo higromicina (NB-HTC). Apenas as células transformadas são capazes de se multiplicarem em higromicina. 4.3) Após cerca de 3 meses em meio com higromicina e 10 dias em meio de pré-regeneração, os calos de arroz são transferidos para meio de regeneração. 4.4) Plantas regeneradas são mantidas por ao menos 2 semanas em meio MS½ contendo higromicina. 4.5) As plantas que sobrevivem à higromicina são passadas para solo. A) Planta não-transformada (NT). B) *OsAPx1/2s-5*. C) *OsAPx1/2s-10*.

A figura 5 mostra a confirmação da inserção da construção "hairpin" nas plantas transformadas. Foto do gel obtido a partir da amplificação por PCR de DNA extraído de plantas transformadas e não-transformada. O primer *Hpt* foi utilizado na amplificação (456pb). Planta contendo o gene *Hpt* foi utilizada como controle positivo.

A figura 6 mostra plantas *OsAPx1/2s* linhagens 5 e 10 e plantas não-transformadas (NT) submetidas à solução hidropônica pH 4,0 com alumínio 100ppm (6.1) e na ausência de alumínio (6.2). As plantas foram mantidas em solução hidropônica por 14 dias.

A figura 7 mostra plantas *OsAPx1s* com redução da expressão transcricional do gene *OsAPx1* citosólico. As plantas nas fotos 7.1 e 7.2 estão no solo há dois meses. Na foto 7.3, são apresentadas planta NT e 3 diferentes linhagens de *OsAPx1s* (linhagens 6, 30 e 40). A planta NT, com mesma idade das plantas RNAi, está em estágio de florescimento.

A figura 8 descreve a extração de RNA total e síntese de cDNA. 8.1) Gel de agarose ilustrativo do RNA total extraído com Trizol. 8.2) Resultado do PCR

do cDNA de folhas de plantas RNAi. A reação de PCR foi realizada com primer *OsPIP1.2* (201pb).

A figura 9 descreve a expressão relativa dos genes da família *OsAPx* em plantas *OsAPx1s* por RT-PCR quantitativo. O gráfico respresenta o logarítmo da expressão dos genes *OsAPx* relativo à expressão dos genes *FDH* e *Ubiquitina* em plantas NT e em 3 linhagens *OsAPx1s*. A normalização dos resultados foi feita em relação a expressão relativa do gene *OsAPx1* em plantas não-transformadas.

A figura 10 mostra plantas *OsAPx2s* com redução da expressão transcricional do gene *OsAPx2* citosólico. Na foto são apresentadas plantas não-transformadas (NT) e 2 plantas da linhagem *OsAPx2s-13*.

A figura 11 descreve a Expressão relativa dos genes da família *OsAPx* em plantas *OsAPX2s* por RT-PCR quantitativo. O gráfico representa o logarítmo da expressão dos genes *OsAPx* relativo à expressão dos genes *FDH* e *Ubiquitina* em plantas não-transformadas (NT) e média de 3 plantas da linhagem *OsAPx2s-13*. A normalização dos resultados foi feita em relação a expressão relativa do gene *OsAPx1* em plantas não-transformadas.

A figura 11a mostra a tolerância reforçada ao alumínio de plantas *OsAPX1/2s* em relação à plantas não transformadas (NT). A) Mudanças cresceram em meio hidropônico suplementado com 20 ppm de alumínio. Experimentos foram realizados com progenia T1 de três linhas independentes *OsAPX1/2s* (a. *OsAPX1/2s-5*, b. *OsAPX1/2s-10* e c. *OsAPX1/2s-11*). B) Localização *in situ* de H_2O_2 determinado por coloração DAB em folhas de plantas silenciadas e NT submetidas ao estresse por alumínio. Determinações foram realizadas com mudas de 20 dias imediatamente (+Al 0 min), 30 minutos (+Al 30 min), 1 hora (+Al 1h) e 1 dia (+Al 1dia) após o início do estresse. Após 1 hora sob estresse por alumínio plantas transgênicas *OsAPX1/2s* acumularam maior conteúdo de H_2O_2 que plantas NT, mas voltaram ao nível normal em ambas as plantas após 24 horas sob estresse.

A figura 11b mostra o efeito da exposição em 20 ppm de alumínio na expressão dos genes *OsAPx* em plantas NT (NT+Al) e plantas silenciadas (*Apx1/2s* + Al).

Plantas mantidas sob condições controle de crescimento (NT e *OsAPX1/2s*) foram usadas como controle. A acumulação do mRNA *OsAPx* foi determinada por qRT-PCR usando 3 diferentes genes constitutivos (fator de alongamento, FDH, e ubiquitina) para normalizar a expressão gênica. A normalização de todos os genes foi feita usando o nível de transcrição de *OsAPx1* em plantas NT. Valores representam os meios \pm SD (n=3).

A figura 11 c mostra a caracterização bioquímica de plantas *OsAPx1/2s* sob estresse por alumínio. Efeito do silenciamento de genes *OsAPx* citosólicos na resposta das plantas para tratamento com alumínio em relação à suas atividades de APX (A), SOD (B), CAT (C) e aos seus conteúdos de AsA (D), TBARS (E) E H₂O₂ (F). Determinações foram realizadas em arroz transgênico *OsAPx 1/2s* (barras pretas e cinzas escuras) e plantas não transformadas (NT) (barras brancas e cinzas claras) de plantas com 8 semanas de idade crescidas sob 40 ppm de alumínio. Valores representam os meios \pm SD (n=3). Diferentes letras (a-c) no topo das barras de erro indicam diferentes meios estatísticos (P<0,05). A figura 12 mostra plantas *OsAPx3/4s* com redução da expressão transcricional de ambos genes *OsAPx* peroxissomais. NT-Planta não-transformada.

A figura 13 descreve a expressão relativa dos genes da família *OsAPx* em plantas *OsAPx3/4s* por RT-PCR quantitativo. O gráfico representa o logaritmo da expressão dos genes *OsAPx* relativo à expressão dos genes FDH, eF e Ubiquitina em plantas NT e em 4 linhagens *OsAPx3/4s*. A normalização dos resultados foi feita em relação a expressão relativa do gene *OsAPX1* em plantas não-transformadas.

A figura 14 mostra plantas *OsAPx3s* com redução da expressão transcricional do gene *OsAPx3* peroxissomal. NT- Planta não-transformada.

A figura 15 descreve a expressão relativa dos genes da família *OsAPx* em plantas *OsAPx3s* por RT-PCR quantitativo. O gráfico representa o

logaritmo da expressão dos genes *OsAPx* relativo à expressão dos genes *FDH* e *Ubiquitina* em plantas não-transformadas (NT) e em 2 linhagens independentes *OsAPx3s*. A normalização dos resultados foi feita em relação à expressão relativa do gene *OsAPx1* em plantas não-transformadas.

5 A figura 16 mostra plantas *OsAPx4s* com redução da expressão transcricional do gene *OsAPx4* peroxissomal. NT- Plantas não-transformadas.

A figura 17 descreve a expressão relativa dos genes da família *OsAPx* em plantas *OsAPx4s* por RT-PCR quantitativo. O gráfico representa o
10 logaritmo da expressão dos genes *OsAPx* relativo à expressão dos genes *FDH* e *Ubiquitina* em plantas não-transformadas (NT) e em 3 linhagens *OsAPx4s*. A normalização dos resultados foi feita em relação a expressão relativa do gene *OsAPx1* em plantas não-transformadas.

Descrição Detalhada da Invenção

15 Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Construção do vetor visando o silenciamento gênico

A estratégia utilizada para caracterizar funcionalmente os genes
20 codificantes de APX citosólicas e peroxissomais foi o silenciamento por RNA de interferência. O primeiro passo foi determinar para cada gene a ter sua expressão transcricional reduzida, a melhor seqüência para a construção do mRNA com estrutura "hairpin".

Realizando análises *in silico*, regiões específicas de aproximadamente
25 250 pb da região transcrita dos genes *APx1* (número de acesso NCBI D45423), *APx2* (número de acesso NCBI AB053297), *APx3*. (número de acesso NCBI AY382617) e *APx4* (número de acesso NCBI AB114856.1) foram escolhidas para o silenciamento individual de cada gene (Listagem de seqüências, ao final desta descrição detalhada). Objetivando obter a redução da expressão de
30 ambos genes codificantes de isoenzimas de mesma localização subcelular, buscou-se regiões conservadas entre os genes *APx1* e *APx2* e entre os genes

APx3 e *APx4*. Para o silenciamento simultâneo das isoformas citosólicas, uma região de 250 pb do gene *APx2* foi utilizada. O gene *APx1* apresenta 26 nucleotídeos contínuos idênticos à seqüência de *APx2* escolhida, o que levaria o seu silenciamento pós-transcricional. Uma região do gene *APx4* foi utilizada para o silenciamento simultâneo de ambos genes codificantes de APX peroxissomais. O gene *APx3* apresenta 19 nucleotídeos contínuos idênticos à seqüência de *APx4*. As regiões escolhidas para o silenciamento dos genes alvos, apresentam no máximo 14 nucleotídeos contínuos idênticos nos outros genes da família de *APx*, o que teoricamente evita o silenciamento pós-transcricional por RNAi destes genes. Devido à grande similaridade entre os genes *APx1* e *APx2*, a melhor seqüência para o silenciamento individual de cada gene apresenta 20 nucleotídeos contínuos idênticos no outro gene. Maiores detalhes das seqüências utilizadas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1

Construções RNAi	<i>OsAPx1s</i>	<i>OsAPx2s</i>	<i>OsAPx3s</i>	<i>OsAPx4s</i>	<i>OsAPx1/2s</i>	<i>OsAPx3/4s</i>
<i>OsAPx1s</i>	15% (20 nt)	8% (9 nt)	9% (6 nt)	6% (7 nt)	4% (5 nt)	7% (6 nt)
<i>OsAPx2s</i>	53% (20 nt)	35% (6 nt)	37% (8 nt)	29% (7 nt)	18% (4 nt)	22% (8 nt)
<i>OsAPx3s</i>	58% (11 nt)	58% (11 nt)	70% (14 nt)	50% (12 nt)	40% (11 nt)	47% (6 nt)
<i>OsAPx4s</i>	32% (6 nt)	34% (8 nt)	63% (14 nt)	25% (6 nt)	21% (6 nt)	28% (12 nt)
<i>OsAPx1/2s</i>	61% (9 nt)	60% (14 nt)	55% (9 nt)	57% (8 nt)	62% (9 nt)	58% (12 nt)
<i>OsAPx3/4s</i>	67% (11 nt)	67% (9 nt)	60% (11 nt)	57% (11 nt)	60% (9 nt)	62% (10 nt)

“Primers” específicos às seqüências escolhidas foram utilizados para obtenção de produtos amplificados por PCR. O produto do PCR foi então clonado no vetor Gateway pDONOR ou pENTR, os quais, em seguida, foram recombinados no vetor pANDA (MIKI & SHIMAMOTO, 2004) (Figura 2). O produto de PCR foi incorporado por recombinação no vetor no sentido senso e

antisense, cuja transcrição leva a formação de estrutura "hairpin". Neste vetor, a transcrição da seqüência introduzida é regulada pelo promotor ubiquitina (UBI) de milho. Entre o promotor e as seqüências introduzidas está presente um íntron para aumentar a expressão do RNA. Uma seqüência do gene β -glucuronidase (*Gus*) encontra-se entre as 2 regiões inseridas. O vetor pANDA apresenta terminador NOS. Os genes de seleção presentes no vetor são o gene de resistência à higromicina (*Hpt*) e o gene de resistência à canamicina (*NptII*).

Transformação de *Escherichia coli*

10 Após a obtenção do vetor pANDA com as seqüências específicas para o silenciamento pós-transcricional, foi feita a clonagem do vetor em *Escherichia coli XL1 blue* competente. As bactérias competentes para eletroporação foram preparadas seguindo o protocolo descrito a seguir. Uma pré-cultura foi preparada inoculando a bactéria em 50mL de meio de cultura Luria-Broth (LB) líquido e mantendo a mesma sob agitação constante de 225 rpm, a 37°C por 15 16 horas. Dilui-se 10 mL da pré-cultura em 1 litro de LB líquido e esta foi mantida sob agitação nas mesmas condições anteriores até a cultura atingir densidade ótica de 0,5-0,8 a 600 nm. A cultura foi resfriada no gelo por 30 minutos e, a seguir, centrifugada a 4000 x g por 15 minutos, a 4°C. Após o 20 descarte do sobrenadante, o precipitado contendo as células concentradas foi ressuspendido em 1 litro de água destilada a 4°C. A centrifugação foi repetida e a lavagem das células com água destilada foi realizada com 500 mL. A mistura foi centrifugada novamente à 4000 x g por 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi então ressuspendido em 3 mL de glicerol 10% a 25 4°C, dividido em alíquotas de 80 μ L e armazenado em nitrogênio líquido. Durante a manipulação, as amostras foram conservadas no gelo.

Para a transformação de *Escherichia coli* por eletroporação, um volume entre 1 e 1,5 μ L de DNA recombinado foi homogeneizado com 40 μ L de bactéria competente e eletroporado na voltagem de 2,5. Após a eletroporação, 30 250 μ L (LB) líquido foi acrescentado à cubeta de eletroporação. O material foi então transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e mantido a 37°C

por 1 hora. Volumes de 50 e 300 μL do meio de cultura contendo as bactérias foram plaqueados em 2 placas com meio LB sólido contendo canamicina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para seleção de bactérias transformadas. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas. As colônias de bactérias que cresceram no meio
5 contendo canamicina foram selecionadas e realizado o protocolo de Miniprep (ver o protocolo à seguir). A transformação das colônias de bactérias selecionadas foi confirmada por PCR utilizando os primers específicos da construção "hairpin".

Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

10 As células *A. tumefaciens* foram transformadas por choque térmico. O primeiro passo da transformação foi a obtenção de células competentes. Essas células foram produzidas inoculando *A. tumefaciens* AGL1 em 4 mL de LB líquido contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rifampicina. Esta pré-cultura foi mantida a 28°C sob agitação constante de 225 rpm por 1 a 2 dias. Volume de 500 μL da pré-
15 cultura foi inoculado em 50 mL de LB líquido contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rifampicina. A cultura foi mantida a 28°C sob agitação constante por 1 dia (densidade ótica de 0,5 a 600 nm). A mistura foi então centrifugada à $5000 \times g$, por 5 minutos a 4°C . Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em 2 mL de LB líquido. Alíquotas de 200 μL foram armazenadas
20 em Nitrogênio líquido e descongeladas somente no momento da transformação.

Para a transformação de *A. tumefaciens* por choque térmico, 1 μg de DNA (vetor pANDA recombinado) foi homogeneizado a 200 μL de células de *A. tumefaciens* competentes. Após congelamento por 5 minutos em N_2 líquido, a
25 mistura foi incubada a 37°C por 25 minutos. A seguir, as células foram transferidas para um novo tubo contendo 1 mL de LB líquido e incubadas a 28°C por 1 hora sem agitação e por mais 2 horas sob agitação constante. As células foram concentradas centrifugando-as por 3 minutos a $13000 \times g$. O precipitado de células foi ressuspenso em 500 μL de LB líquido. As bactérias
30 em cultura líquida foram plaqueada em LB sólido contendo 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de

canamicina, 100 µg/mL de rifampicina. As placas foram mantidas a 28°C por 2 dias.

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

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

A transformação de *Oryza sativa* L. superespécie *japonica* cultivar Nipponbare foi mediada por *Agrobacterium tumefaciens* segundo protocolo descrito por UPADHYAYA *et al.*, 2000. A seguir está descrito o protocolo utilizado. Os meios de cultura estão detalhados nas tabelas 2-8 a seguir.

Tabela 2. Meio 20x concentrado de NB (UPADHYAYA *et al.*, 2000).

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

Tabela 3. Meio NB concentrado 20x (UPADHYAYA et al., 2000). A ordem citada na tabela deve ser mantida para evitar precipitação dos sais.

1°	Micro do B5 (100x conc)	200mL
2°	Fe EDTA do MS(100x conc)	200mL
3°	Vitaminas do B5(100x conc)	200mL
4°	Sacarose	180g
5°	Complete c/água q.s.p.	1000mL
6°	(NH ₄) ₂ SO ₄	9,3g
7°	KNO ₃	53,6g
8°	Sacarose	180g
9°	MgSO ₄ .7H ₂ O	3,7g
10°	CaCl ₂ .2H ₂ O	3,3g
11°	Sacarose	180g
12°	KH ₂ PO ₄	8g
13°	Sacarose	60g
14°	Caseína Hidrolisada	6g
15°	Glutamina	10g
16°	Prolina	10g
17°	Complete c/água q.s.p.	2000mL

Distribuir em alíquotas de 50mL e 100 mL

mantenha aquecido e só coloque o seguinte quando o anterior estiver dissolvido

Tabela 4. Soluções estoques de B5 (GAMBORG, 1968).

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

5 ** é recomendável fazer um sub estoque G' para melhor precisão de pesagem

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

Tabela 5. Soluções Estoques de MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962)

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

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

**note que é necessário fazer um sub estoque G' para melhor precisão de pesagem

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

- 5 Tabela 6. Meio MS 10X concentrado para o volume de 20 litros (MURASHIGE E SKOOG, 1962). Em um erlenmeyer de 2L deve ser colocado primeiro os líquidos F, G e H e depois os sais, antes de colocar a sacarose, complete para 1L, pois esse aumenta muito o volume da solução, complete para 2 litros e deixe dissolver bem antes de separar em alíquotas de 50mL e 100mL, coloque no freezer devidamente fechado e identificado.

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

COMPLETAR PARA
2000mL

Tabela 7 Meios de cultura de tecidos de arroz – *Oryza sativa* L. subespécie japônica cv. Nipponbare.

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

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

Tabela 8. Meios de cultura de tecidos de arroz – *Oryza sativa* L. subespécie japonica cv. Nipponbare.

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

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

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

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

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

- 1) Cerca de 30 calos saudáveis foram transferidos para nova placa de NB (2 placas de NB foram utilizadas por transformação).
- 2) No terceiro dia do passo 1, duas placas de *A. tumefaciens* contendo a construção foram repicadas em placas de meio LB contendo rifampina (100 µg/mL) e canamicina (25 µg/mL) e mantidas a 28°C.
- 3) Após o segundo dia do passo 2, as bactérias foram transferidas para 50 µL NB líquido suplementado com 100 µM de

acetoseringona. Os calos do passo 1 foram adicionados ao meio contendo bactérias e acetoseringona.

- 5 4) Após incubação de 10 minutos, o meio líquido foi descartado e os calos foram então transferidos para placas contendo meio NB sólido com 100 μ M de acetoseringona (NBA). As placas foram mantidas no escuro a 28°C por 3 dias.
- 10 5) Após o co-cultivo, os calos foram lavados com 50 mL de água destilada autoclavada contendo timentina (150 mg/mL). Foram realizadas 3 a 4 lavagens por 10 a 15 minutos em agitação constante.
- 15 6) Quando a solução contendo os calos ficou límpida, os calos, inicialmente passados para placa com papel filtro estéril, foram transferidos para placa NB-HTC, meio que contém Higromicina (50 μ g/mL), Timentina (150 μ g/mL) e Cefotaxima (200 μ g/mL) (visando a seleção dos calos transformados resistentes à higromicina e a eliminação de bactérias restantes). As placas foram incubadas no escuro por 30 dias a 28°C.
- 20 7) Novos calos resistentes foram então selecionados para nova placa de NB-HTC, tendo-se o cuidado de transferir apenas 1 calo de cada evento. A placa foi mantida a 28°C no escuro.
- 25 8) Após cerca de 3 semanas, os calos transformados resistentes à higromicina que cresceram no meio NB-HTC foram novamente transferidos para nova placa, eliminando-se os calos não resistentes.
- 30 9) Após proliferação, os calos foram transferidos para meio de pré-regeneração. Mantidos por 8 a 10 dias no escuro a 28°C. O mesmo foi feito com calos não-transformados para obtenção de plantas não-transformadas (controles).
- 30 10) Após a incubação no meio de pré-regeneração, os calos foram transferidos para meio de regeneração e mantidos na luz a 28°C.

11) A partir de 20 dias, os calos transformados regeneraram plantas. Plantas com raiz e parte aérea adequadas foram transferidas para meio MS½ contendo higromicina (50 µg/mL). Este foi um passo adicional de seleção. Os calos não-transformados foram transferidos para meio MS½ na ausência de higromicina. As plantas foram mantidas na luz a 28°C.

12) Após no mínimo 14 dias no meio MS½ com higromicina, as plantas resistentes foram transferidas para vermiculita contendo solução nutritiva (soluções concentradas de A-G conforme Apêndice 2.4) ou foram diretamente transferidas para o solo. As plantas na vermiculita foram transferidas para o solo após cerca de 3 semanas. Inicialmente, as plantas foram mantidas fechadas com plástico para aclimatização e aos poucos este foi sendo removido.

13) As plantas em vasos foram mantidas a 28°C em fotoperíodo de 12 horas de luz, submersas em água. A cada 2 semanas, era adicionado fertilizante à água de submersão.

Minipreparação de plasmídeo (Miniprep)

Após a clonagem do vetor RNAi em *Escherichia coli* e da transformação de *Agrobacterium tumefaciens*, colônias isoladas de bactérias foram selecionadas e lançadas em 4mL de meio de cultura LB líquido contendo canamicina (25 µg/mL). Quando se cultivava *A. tumefaciens*, rifampicina (100 µg/mL) era também adicionada ao meio. A extração de plasmídeos ou miniprep foi realizada de acordo com SAMBROOK *et al.*, 1989. Células de 1,5 mL da suspensão de bactérias foram concentradas por centrifugação em 13000xg por 1 minuto. Após o descarte do sobrenadante, 200 µL da solução I (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM; glicose 25 mM) foi adicionado às células com homogeneização em vortex. Em seguida, a solução II (200 µL) contendo NaOH 0,2M e SDS 1% foi misturada lentamente por inversão à mistura anterior. Finalizando esta etapa, 200 µL da solução III (Acetato de sódio 5M pH 5,2) foi adicionada e homogeneizada as outras por inversão. Após centrifugação por 5

minutos à 13000 x g, 600 µL do sobrenadante foi transferido para novo tubo. Os plasmídeos foram então precipitados utilizando 600 µL de isopropanol e centrifugação por 20 minutos em 13000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 350 µL de etanol 70%. A mistura foi centrifugada por 5 minutos à 13000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi secado em estufa a 37°C. Os plasmídeos extraídos foram ressuspensos em 50 µL de água MiliQ autoclavada.

Extração de DNA

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

Extração de RNA

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

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

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

20 O pellet de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 70% para cada 1mL de Trizol inicial. As amostras foram agitadas em vortex e centrifugadas a 7500 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi secado em estufa a 37°C. O RNA foi ressuscitado em 30 µL de água MiliQ autoclavada.

25 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima transcriptase reversa M-MLV RT (Promega). A reação da transcriptase reversa foi feita para um volume final de 50 µL. Inicialmente, foi preparado o Mix I contendo 1 µL de Poli T-V (23 bases) (0,5 µM), 1 µL de dNTP 10 mM e 8 µL de água MiliQ
30 autoclavada para cada reação. Ao volume de 10 µL do Mix I foi adicionado 2 µL

de RNA e homogeneizado por pipetagem. As amostras foram incubadas à 65 °C por 5 minutos, seguido imediatamente de 5 minutos no gelo. A cada amostra foi adicionado 38 µL do Mix II contendo 10 µL de tampão 5X, 27 µL de água MiliQ autoclavada e 1 µL de enzima M-MLV RT (200 U/µL). As soluções foram homogeneizadas por pipetagem. As amostras foram incubadas por 2 horas a 37°C. Após o tempo de incubação, a enzima foi inativada à temperatura de 70°C por 15 minutos. A solução estoque foi então preparada diluindo 10 vezes o volume final de 50µL obtido na síntese de cDNA. Para as reações de PCR em Tempo Real, a solução estoque foi diluída 10 vezes (diluição final 1:100).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

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

As reações de PCR foram realizadas para confirmação da transformação de *Escherichia coli* e *Agrobacterium tumefaciens*. Nessas reações foram utilizados os primers específicos para cada construção RNAi: *OsAPx1s*, *OsAPx2s*, *OsAPx3s*, *OsAPx4s*, *OsAPx1/2s* e *OsAPx3/4s*.

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

Reações de PCR foram realizadas para analisar o cDNA sintetizado. Para este fim foram utilizados primers específicos de *OsPip1.2* (*OsPip1.2F*: 5'

GTTTGCGGTGTT CTTGGTTC; *OsPip1.2R*: TTGAATGGAATTGCCCTGAT), gene constitutivo em folhas de plantas de *Oriza sativa* L. *japonica* cv. Nipponbare.

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

PCR em Tempo Real Quantitativo (qRT-PCR)

As análises da expressão dos genes da família APX foi realizada por PCR em Tempo Real (Applied Biosystem 7500 Real-time PCR System), após a síntese de cDNA a partir das folhas de plantas transformadas e não-transformadas.

A expressão relativa dos genes APx foi obtida utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (GACHON *et al.*, 2004; WONG & MEDRANO, 2005). Os genes que serviram de controles internos utilizados para a normalização da concentração de mRNA nas amostras foram *Formaldeído Desidrogenase (FDH)* (Número de Acesso GenBank U77637.1), *Ubiquitina (Ubi)* (Número de Acesso GenBank AK103230) e “*elongation Factor*” (*eF*) (Número de Acesso GenBank AJ252135). A amplificação dos genes APx e dos controles internos foi realizada utilizando primers específicos, os quais foram desenhados para obter fragmentos de DNA de tamanho entre 180 a 250 pares de bases. Os primers específicos para amplificação de cada gene APx estão descritos no Apêndice 1. O par de primers específicos para os normalizadores são *eF1a* F: 5' TTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT e *eF1a* R: 5' GACTTCCTTCACGATTCATCGTAA; *FDH* F: CAAATCAGCTGGTGCTTCTC e *FDH* R: TTCCAATGCATTCAAAGCTG; *Ubi5* F: ACCACTTCGACCGCCACTACT e *Ubi5* R: ACGCCTAAGCCTGCTGGTT.

Estresses Abióticos

Alta Intensidade de Radiação UV-B em Plantas Jovens

Plantas não-transformadas e plantas da geração T1 das linhagens 5 e 10 de *OsAPx1/2s* com 30 dias de idade foram submetidas à radiação UV-B

durante 4 horas por 2 dias consecutivos. As plantas expostas ao estresse encontravam-se em solução hidropônica Furlani & Furlani (48 mg/L N-NO₃⁻; 12 mg/L N-NH₄⁻; 200 mg/L Ca; 200 mg/L K; 40.6 mg/L Mg; 8.0 mg/L P; 151 mg/L S; 234 mg/L Cl; 4.85 mg/L Fe; 0.67 mg/L Mn; 0.36 mg/L B; 0.20 mg/L Zn; 0.05 mg/L Cu; 0.11 mg/L Mo) (Furlani and Furlani, 1998). No terceiro dia (24 horas após o último período de estresse), pool de folhas foram coletas para análise de clorofila-A, conforme protocolo descrito por XING e colaboradores (2007). As folhas maceradas foram colocadas em etanol 95% e mantidas no escuro por 16 horas a 4°C. Prosseguiu-se a leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 649 nm e 665 nm. O conteúdo de clorofila-A foi calculada utilizando a seguinte equação:

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

Estresse com Alta Concentração de Alumínio

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

Obtenção das Plantas Transgênicas

As plantas transgênicas foram obtidas a partir da transformação por *Agrobacterium tumefaciens* de calos de arroz (*Oryza sativa* L.) da subespécie *japonica* cultivar Nipponbare. Após a recombinação do vetor pANDA com as seqüências de interesse, o vetor obtido foi introduzido em *Escherichia coli*. Esta etapa foi efetuada para obtenção de quantidade suficiente dos vetores pANDA recombinados (pANDA-*OsAPx1/2s*; pANDA-*OsAPx1s*; pANDA-*OsAPx2s*; pANDA-*OsAPx3/4s*; pANDA-*OsAPx3s*; pANDA-*OsAPx4s*). Após isolamento dos plasmídeos por Miniprep e quantificação dos mesmos em gel de agarose, aproximadamente 1 µg de DNA plasmidial foi utilizado para a transformação de *Agrobacterium tumefaciens*. As transformações de *Escherichia coli* e de

Agrobacterium tumefaciens foram confirmadas por PCR. Os primers utilizados foram os mesmos utilizados na amplificação das seqüências das construções "hairpin" (Listagem de seqüências, ao final desta descrição detalhada). As Figuras 2 e 3 são representativas dos resultados obtidos por PCR para confirmação da transformação de bactérias.

A transformação de calos de arroz com *A. tumefaciens* consiste de duas etapas de seleção com higromicina: a primeira ocorre na fase de calos e a segunda após a regeneração de plantas (Figura 4). O vetor pANDA apresenta o gene HPT que confere resistência à higromicina. Desta forma, apenas os calos e as plantas transformadas são capazes de sobreviver em meio de cultura com este antibiótico. A presença do T-DNA nas plantas obtidas pela transformação foi ainda confirmada por PCR utilizando primers desenhados para o gene HPT ou para o gene GUS, ambos presentes no vetor pANDA. A Figura 5 é representativa dos géis de PCR obtidos na confirmação das plantas transgênicas.

Caracterização Funcional dos genes das Ascorbato Peroxidases Citosólicas Silenciamento Simultâneo dos Genes OsAPx1 e OsAPx2 em arroz

As regiões codificantes dos genes OsAPx são bem conservadas (seqüência de nucleotídeos e aminoácidos identidades entre os membros são 72% a 82% e 78% a 95%, respectivamente), e existem trechos contíguos de nucleotídeos nas quais 21 a 49 bases são idênticas entre genes OsAPx que codificam proteínas localizadas no mesmo compartimento subcelular. Delineamos uma repetição inversa (IR) para construir a transcrição do dsRNA constituído por um fragmento de 250bp de uma região específica do gene OsAPx2, mas que contém 82% de identidade com uma região do gene OsAPx1. Partes da região selecionada com um trecho da seqüência OsAPx1 de 26 bases com perfeito emparelhamento. Esta região não dispõe de mais de 62% de identidade ou 14 seqüências de emparelhamento perfeitas com outro membro da família de genes OsAPx, o que nos permitiu o alvo especificamente citosólico de genes APX com a construção "hairpin". Transformamos a RNAiAPx1/2 construída no arroz e produzimos 23 linhas transgênicas

independentes de plantas que transportam o gene "hairpin". Todas as plantas transgênicas (APx1/2s) obtidas não apresentaram nenhuma alteração visível no fenótipo quando crescendo em condições controle (Figura 4). Análises de PCR de transcrição reversa quantitativa de OsAPx1 e OsAPx2 mRNAs em arroz transgênico mostrou que a expressão ambos os genes citosólicos OsAPx foram fortemente reduzidos em todas as linhas regeneradas transgênicas OsAPx1/2s. Foram analisados um total de 9 plantas transgênicas independentes e observou-se eficiente supressão do OsAPx1 e OsAPx2 mRNAs em todos eles.

Análises bioquímicas mostraram que a atividade APX foi reduzida em 20-40% nas linhas OsAPx1/2s. Por outro lado, as atividades da catalase, ascorbato oxidase e SOD foram significativamente reforçadas nestas plantas transgênicas. Também foi medido o conteúdo da forma reduzida do ascorbato, H₂O₂ e TBARS em extratos de folhas não transformados e a dupla APx1/2 de plantas silenciadas. As plantas OsAPx1/2s tinham níveis mais elevados de H₂O₂ e AsA. No entanto, o nível de TBARS diminuiu em comparação a plantas transgênicas de plantas não-transformadas.

Efeito da redução da capacidade de seqüestro H₂O₂ citosólica na acumulação peroxisomal e chloroplastic / mitochondrial APX mRNA

Para investigar a expressão de diferentes genes OsAPx em resposta ao silenciamento da expressão gênica de OsAPx citosólico nós analisamos a acumulação de transcrição de todos os membros da família do gene OsAPx (OsAPx1-OsAPx8) por qRT-PCR em experimentos plantas regeneradas maduras. Os resultados expressaram como média de três medidas independentes revelam que a expressão da maioria desses genes é alterada em resposta ao silenciamento simultâneo dos genes OsAPx1 e OsAPx2. Apenas o OsAPx6 mitocondrial não foi afetado pelo silenciamento do gene citosólico OsAPx. Interessantemente, enquanto OsAPx3 foi fortemente reprimido, OsAPx4, que está próximo do APx3 apresentando apenas 50% de redução sobre o nível de acumulação de mRNA. As expressões cloroplásticas OsAPx7 e OsAPx8 também foram ambas reduzidas em 50%.

Resultados similares foram obtidos quando plantas transgênicas da geração T1 foram utilizados na análise. No entanto, o nível de OsAPx2 silenciamento sobre essas gerações foi reduzida nessas gerações quando comparadas com a plantas regeneradas. Por outro lado, quando a mesma análise foi feita utilizando-se plantas jovens (5 dias de idade) a redução de expressão do conjunto de genes OsAPx, que não foram orientados pelo RNAi construído, não foi observado.

Resposta do duplosilenciamento OsAPx1/OsAPx2 de arroz transgênico a estresse abiótico

Plantas de duplo silenciamento nos OsAPx1 e OsAPx2 foram submetidos a estresses abióticos e as respostas a estes tratamentos foram analisadas. A localização in situ de H₂O₂ por coloração DAB revela que, em plantas transgênicas silenciadas o teor de H₂O₂ foi mantido elevado após 30 minutos do fim do tratamento com radiação UV germicida. Neste momento, 30 minutos após a interrupção do tratamento, o conteúdo reduzido de H₂O₂ para níveis controle de plantas não-transformadas. Apesar deste resultado, plantas não transformadas e silenciadas foram igualmente visualmente afetadas pelo stress UV e o conteúdo de clorofila foi semelhante em ambas as plantas não transformadas e silenciadas.

A análise da expressão de diferentes genes em resposta à irradiação UV foi realizada em plantas não-transformadas em duplo silenciamento de arroz. A radiação UV-B aumentou a expressão de OsAPx1 e OsAPx7; e reduziu o nível de transcrição de OsAPx5 e OsAPx8 em plantas não-transformadas. OsAPx2, OsAPx3, OsAPx4, OsAPx6 genes não foram significativamente alterados por este tratamento. Em plantas silenciadas a indução do OsAPx1 promovida pela radiação UV-B não foi capaz de ultrapassar o silenciamento pós-transcricional produzido pelo "hairpin" construído. No entanto, o tratamento foi capaz de reduzir ao menor nível de expressão de OsAPx5, em comparação com o já reduzido nível da transcrição desse gene em plantas duplamente silenciadas não-estressadas. Além disso, a expressão de OsAPx4 foi reduzida em planta

transgênica estressada. Este resultado contrasta com a resposta das plantas não-transgênicas submetidas à irradiação UV-B.

Para analisar o efeito do silenciamento dos genes citosólicos OsAPx em resposta ao estresse ao alumínio, temos o crescimento de mudas de arroz na presença de 20ppm alumínio. Figura 11aA mostra o resultado de um experimento representativo utilizando três linhas transgênicas independentes. Pode-se observar que as plantas transgênicas silenciadas são mais saudáveis do que de plantas não-transformadas que crescem na presença de 20ppm de alumínio (Figura 11a). Para verificar se o nível de H_2O_2 varia durante este tratamento, e se as respostas das plantas transgênicas não diferiram das plantas não transformadas foi realizado um experimento no qual mudas de quatro semanas foram submetidas a 20ppm de alumínio durante 24 horas. A localização *in situ* de H_2O_2 por coloração DAB revelou que, em resposta ao alumínio, os níveis de peróxido de hidrogênio aumentaram uma hora após o início do tratamento em plantas transgênicas e não-transgênicas. No entanto, os níveis de H_2O_2 , neste ponto no tempo são significativamente maiores nas plantas silenciadas do que em plantas não-transformadas (Figura 11aB). A transcrição de diferentes níveis de genes OsAPx foram quantificados na parte aérea das plantas de 5 dias após 8h deste tratamento (Figura 6). Níveis de transcrição de OsAPx1 e OsAPx3 foram significativamente aumentados em resposta ao tratamento com alumínio de plantas não-transformadas. Plantas silenciadas não foram capazes de induzir a transcrição desses genes nos mesmos níveis de plantas não-transformadas. No entanto, de forma diferente para o controle de plantas não-transformadas, a dupla de plantas silenciadas OsAPx1/OsAPx2 induzidas aumentou dos níveis de mRNA correspondente aos genes peroxisomal OsAPx4 e cloroplástico OsAPx8.

Plantas maduras foram também submetidas ao tratamento com 40ppm de alumínio durante 2 semanas e analisados parâmetros bioquímicos (Figura 11c). Os resultados mostraram que o total da atividade de APX aumentou em plantas não-transformadas, em resposta ao tratamento (Figura 11cD). Plantas silenciadas apresentaram menor nível de atividade de APX, mas ainda são

capazes de induzir essa atividade em resposta ao alumínio. No entanto, o nível induzido em plantas silenciadas ainda é cerca de 50% inferior à atividade de APX de plantas não-transformadas controle. A atividade SOD foi induzida em ambos, plantas não transgênicas e silenciadas. As atividades da catalase não variaram em resposta ao tratamento. TBARS aumentou em ambas as plantas submetidas ao alumínio, mas o nível foi maior em plantas transgênicas, em comparação com as plantas não-transgênicas. A concentração da forma reduzida do ascorbato também foi determinada. O conteúdo AsA foi maior em plantas silenciadas tanto em condições de crescimento em estresse como no controle. Em ambas as plantas o teor de AsA aumentou em resposta ao alumínio, porém, em plantas silenciadas esse valor foi significativamente maior. A concentração de peróxido de hidrogênio foi também determinada nessas plantas. Os resultados mostraram que tanto as plantas não transformadas como silenciadas mostraram um significativo aumento de alumínio induzido na concentração H_2O_2 em paralelo com os níveis de peroxidação lipídica salientada (Figura 11c).

Efeitos de tratamentos com H_2O_2 exógenos sobre a expressão da família do gene APX do arroz.

Todos os transgênicos OsAPx1/2s apresentaram maior teor de H_2O_2 . A fim de verificar como H_2O_2 pode modular a expressão da família gênica OsAPx, temos tratado de plantas não-transformadas com $10\mu M$ de H_2O_2 exógeno. qRT-PCR indicou que ambos os genes citosólicos OsAPx são modulados por H_2O_2 ; além disso, a expressão de OsAPx5, OsAPx6 e OsAPx7 também foi significativamente alterada por este tratamento. É notável que apenas genes que codificam enzimas solúveis foram induzidos por H_2O_2 , em contrapartida, todos os genes que codificam isoformas do limite da membrana (peroxisomal OsAPx3 e OsAPx4, e tilacóides OsAPx8) não foram afetados pelo H_2O_2 exógeno.

Uma série de estudos recentes com mutantes knockout de *A. thaliana* APX revelaram uma incontestável ligação entre ROS e diferentes processos fisiológicos relacionados ao desenvolvimento da planta e resposta a estresse

biótico e abiótico (Rizhsky et al., 2002; Pnueli et al., 2003; Davletova et al., 2005; Rossel et al., 2006, Lu et al., 2007, Miller et al., 2007). Em contraste a estes estudos, análises de desempenho de mutantes APX knockout utilizando arroz, o modelo de plantas monocotiledôneas, ainda não foram abordadas.

5 Além disso, esses trabalhos não examinaram o efeito de bloqueamento da expressão de todos os genes que codificam isoformas APX presentes em um determinado compartimento subcelular. Em trabalhos anteriores, que descreveram a presença de oito genes codificantes OsAPx no genoma nuclear de arroz (Teixeira et al., 2004) e determinou-se que as proteínas codificadas

10 por esses genes estão localizados em diferentes compartimentos subcelulares (Teixeira et al., 2004; Teixeira et al., 2006). A compreensão da forma como o metabolismo antioxidante é regulado em células vegetais parece ser altamente complexa, uma vez que estas enzimas têm substratos que também funcionam como moléculas sinal e são representadas por várias isoformas orientadas

15 para diferentes compartimentos intracelulares. Os oito membros da família de genes OsAPx do arroz parecem desempenhar papéis diferentes durante o desenvolvimento vegetal e em resposta a estresse abiótico. Dois deles, OsAPx1 e OsAPx2, codificam isoformas citosólicas. A fim de compreender o papel das isoformas localizadas neste compartimento subcelular no

20 metabolismo antioxidante do arroz, foram produzidas linhas transgênicas duplamente silenciadas em ambos os genes OsAPx1 e OsAPx2. Os efeitos desta manipulação genética no crescimento das plantas e na resposta ao estresse foram determinadas. O duplo silenciamento de OsAPx1 e OsAPx2 não produziu qualquer fenótipo visível sugerindo que um mecanismo

25 compensatório de captura de H₂O₂ foi ativado. Medidas da atividade enzimática indicam que o total da atividade APX das plantas silenciadas duplamente foi reduzida em 20-40%, sugerindo que o silenciamento pós-transcricional destes genes teve reflexo significativo sobre a tradução do mRNA APX. Por outro lado, catalase e atividades SOD foram significativamente reforçadas nestas plantas

30 transgênicas. A maior atividade de diferentes enzimas antioxidantes indica que essas atividades podem compensar a falta do APX citosólico na captura de

ROS. O aumento da atividade de SOD pode indicar que um excesso de elétrons são decorrentes do fotossistema I. Plantas de Tabaco com expressão suprimida APx1 também continham níveis elevados de transcrições correspondentes a CuZnSoD, Catalase e Glutathione Redutase sugerindo a existência de um mecanismo compensatório (Rizhsky et al., 2002). Por outro lado, a resposta das plantas *Arabidopsis* para deficiência de APx1 não afetou o nível de Catalase, CuZnSOD ou Glutathione redutase (Pnueli et al., 2003). O contraste das respostas para a reduzida expressão de genes citosólicos APX em diferentes plantas revela especificidades sobre os sistemas antioxidantes relacionados com linhagens de plantas específicas.

Foi medido o conteúdo do ascorbato, H_2O_2 e TBARS em extratos de folhas de plantas não transformadas e OsAPx1/2 duplamente silenciadas. Os níveis destes compostos representam bons marcadores de estresse oxidativo sofrido pelas plantas. Os níveis mais elevados de H_2O_2 e da forma reduzida do ascorbato sobre plantas OsAPx1/2s correlacionadas com a redução do nível de atividade de APX nestas plantas. O nível reduzido de TBARS em plantas transgênicas comparado ao de plantas não-transformadas indica que o controle em condições de plantas silenciadas pode suportar o elevado nível de H_2O_2 sem penalidade para planta, certamente devido ao eficiente mecanismo compensatório representado por outras enzimas, tais como catalase. As plantas transgênicas também apresentam maiores níveis de atividade da ascorbato oxidase (AO). Ascorbato oxidase é amplamente distribuída e só está presente nas plantas. No entanto, o seu papel biológico ainda não é claro. A enzima pode estar envolvida na defesa de plantas através da modificação do nível de ascorbato e, portanto, no estado redox apoplástico. O conjunto de ascorbato reduzido no apoplasto resultam do equilíbrio entre as entradas a partir de AsA recém-sintetizada transportado do citosol e perdas associadas com metabolismo enzimático e oxidação pela parede celular localizada AO (Smirnof, 2000). O aumento da atividade da AO poderia ser entendido como uma resposta à elevação dos níveis H_2O_2 como resultado da falta de atividade de APX citosólico. As células poderiam perceber como a planta foi submetida

a um estresse ambiental, e, desta forma, a AA foi ativada para equilibrar o estado redox apoplástico. Sanmartin et al. (2007), demonstraram que a modulação da atividade AO ocorre por súbitas mudanças no estado redox apoplástico em resposta a estímulos bióticos ou abióticos. Estresse ao calor e indução por dano desencadeiam a acumulação de mRNA CmAO4 do melão. Além disso, ácido jasmônico (JA), um conhecido hormônio, produz uma regulação positiva da transcrição CmAO4 abundância, enquanto ácido salicílico, um conhecido hormônio antagonista JA, provoca o efeito oposto.

A análise da expressão de todos os membros da família de gene OsAPx silenciados duplamente plantas mostraram que a expressão da maioria desses genes é alterada em resposta ao silenciamento simultâneo de OsAPx1 e OsAPx2 em plantas maduras, mas não em mudas de 5 dias. Além disso, o nível da repressão da acumulação da transcrição de OsAPx3 e OsAPx4, dois genes OsAPx relacionados altamente próximos, diferem largamente. Estes resultados sugerem que a redução da expressão de outros membros da família dos genes APX não foi uma segmentação efeito do RNAi não-específico a, mas pode representar uma resposta aos níveis alterados de moléculas sinal, tais como H_2O_2 e ascorbato (ou outro desconhecido), que o efeito aparentemente foi dependente do estágio de desenvolvimento da planta. Quando plantas silenciadas APx1/OsAPx2 foram submetidas a estresse abiótico, como a radiação UV e tratamento com alumínio, seu conteúdo de H_2O_2 foi significativamente maior quando comparado com níveis acumulados de H_2O_2 de plantas não-transformadas. Apesar disto, plantas não transformadas e silenciadas foram igualmente afetadas pelo estresse ao UV. Além disso, plantas silenciadas parecem ser mais tolerantes ao tratamento com alumínio do que de plantas não-transformadas. Este resultado não era esperado uma vez que genes APX citosólicos são induzidos em resposta a diferentes tipos de estresse, tais como UV, sal (Menezes-Benavente et al., 2004) e tratamento com alumínio (Sharma e Dubey, 2007), sugerindo que sua atividade poderia ser fundamental para a limpeza do excesso de H_2O_2 produzido em resposta a estes estresses. Nossos resultados apontam para

que um mecanismo compensatório antioxidante foi ativado em resposta ao silenciamento pós-transcricional de genes OsAPx citosólicos. Para corroborar esta hipótese, outras enzimas antioxidantes apresentaram maior atividade específica em plantas silenciadas, quando comparados às plantas não-transformadas controle. Os efeitos compensatórios poderiam ser desencadeados pelo aumento no conteúdo das moléculas sinal como H₂O₂ e ascorbato, ou outros compostos sinal ainda não caracterizados. Peróxido de hidrogênio pode ser ativamente produzido pelo metabolismo celular sob condições normais de crescimento, desempenhando papel fisiológico, como a biossíntese e de desenvolvimento relacionados com alterações dos componentes estruturais das paredes celulares (Ros Barceló, 2005). Além disso, dados recentes sugerem que ROS também se comportam como segundo mensageiros. Em bactérias, leveduras e animais, a produção de ROS pode modificar fatores de transcrição redox-sensíveis, que estão envolvidos na ROS-sequestro (Moradas-Ferreira e Costa, 2000; Catani et al., 2001; Georgiou, 2002). Nas plantas, a regulação redox-sensível da expressão gênica também foi descrito (Mou et al., 2003).

A resposta para o silenciamento de genes APX citosólicos em arroz contrastou com o efeito da mutação do gene APx1 em *Arabidopsis thaliana*, que ausente foi responsável pela queda de todo sistema de sequestro de H₂O₂ cloroplástico. Em *Arabidopsis* o APx1 citosólico corresponde a um componente central da rede de genes oxigênio reativos, protegendo os cloroplastos durante o estresse à luz (Davletova et al., 2005). Nossos resultados apontam para um importante papel de APX citosólica no controle do teor de peróxido de hidrogênio, que poderia funcionar como um sinal (ou ativar um sinal), que poderia manter a célula em um estado de alerta permitindo que a planta reaja com o estresse ambiental, tais como nível elevado teor de alumínio. No entanto, em arroz, a alta expressão de genes APX citosólicos não foi fundamental para a sobrevivência da planta ou desenvolvimento sob condições de estresse ou condições controle. Nossos resultados revelaram que o arroz responde de maneira diferente de *Arabidopsis* à falta de genes APX citosólicos sugerindo

que o sistema anti-oxidante da planta é bastante complexo e apresentam especificidades, dependendo da planta analisada. Contrastando com os resultados descritos por Davletova et al. (2005), Asai e colaboradores (2004) demonstraram que em *Arabidopsis*, a falta de APx1 ativa um sistema antioxidativo múltiplo que permitiu plantas mutantes para o desenvolvimento semelhante ao tipo de plantas selvagens. Os motivos do contraste de resultados não são claros, mas poderiam ser explicados pelas diferenças em condições de crescimento que diferem dos dois trabalhos realizados pelos diferentes grupos (Asai et al., 2004). Estes resultados sugerem que os diferentes mutantes obtidos devem ser sistematicamente submetidos a diferentes situações a fim de dar-nos a imagem completa das interações do metabolismo antioxidante em plantas.

Nós tentamos relacionar o teor de H_2O_2 com a modulação da família de genes OsAPx em plantas transgênicas duplamente silenciadas submetidas à condições de estresse. Nossa estratégia foi a de determinar a modulação da expressão de toda a família, em resposta ao tratamento exógeno de H_2O_2 . Nesta análise todos os genes codificantes APX solúveis (OsAPx1, OsAPx2, OsAPx5, OsAPx6 e OsAPx7) foram induzidos por H_2O_2 . No entanto, apesar do aumento do teor de H_2O_2 em plantas transgênicas submetidas ao estresse, suas respostas diferiram das respostas obtidas pelo tratamento de plantas não-transformadas com H_2O_2 . Estes resultados sugerem que o tratamento com o H_2O_2 exógeno não afetou a fisiologia da planta, da mesma forma como quando o H_2O_2 capturando a enzima foi ausente em um determinado compartimento sub-celular.

O conjunto dos nossos resultados revelaram que o APX citosólico e outros sistemas antioxidantes trabalham em um caminho redundante no arroz. Além disso, nestas plantas a redução da expressão de ambos os genes OsAPx citosólicos pode ativar um sistema de resposta ao estresse que pode ser usado sob condições estressantes permitindo que plantas sejam mais tolerantes ao estresse. Outras análises devem ser realizadas a fim de identificar os genes stress-relacionados que são ativados em plantas transgênicas OsAPx1/2s em

resposta à atividade reduzida do APX citosólico, e também o sinal responsável por tal ativação. Como já demonstrado para plantas dicotiledôneas plantas, existe um modo de regulação complexa com a rede ROS nas plantas. Nesta rede, H₂O₂ poderia ser responsável pela comunicação entre os diferentes
5 compartimentos subcelulares. A análise funcional de genes pertencentes a esta rede em uma planta monocotiledônea como arroz pode revelar especificidades deste grupo de plantas e/ou nos ajudar a compreender o complexo altamente processo envolvendo as respostas de plantas ao estresse abiótico.

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

Os experimentos de estresse com alumínio e alta intensidade de luz UV-
15 B em plantas jovens foram realizados com plântulas transformadas 1 (T1). A utilização de T1 nestes experimentos foi possível, pois quase a totalidade das plântulas T1 apresentaram reação de PCR positiva para o T-DNA contendo o "hairpin". A Tabela 9 mostra a proporção de plantas T1 transgênicas.

20 Tabela 9. Análise da integração do T-DNA contendo o "harpin" nas plantas T1 *OsAPx1/2s* por PCR utilizando primer *Hpt* ou *Gus*

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

30

Caracterização Funcional das Ascorbato Peroxidases Peroxissomais

Silenciamento Simultâneo dos Genes *OsAPx3* e *OsAPx4*

Seis diferentes linhagens *OsAPx3/4s* foram regeneradas contendo a construção "hairpin" para o silenciamento de ambos os genes peroxissomais. O tamanho das plantas *OsAPx3/4s* é levemente inferior ao das plantas não-transformadas crescidas em condições ideais de cultivo (Figura 12). Apesar do florescimento das plantas *OsAPx3/4s*, poucas panículas forneceram sementes. A maioria das panículas continha sementes vazias. As plantas *OsAPx3/4s* e as correspondentes não-transformadas de mesma idade são ainda mantidas na casa de vegetação. Após 1 ano em terra, as plantas *OsAPx3/4s* perderam a capacidade de florescer, diferentemente das plantas controle que ainda fornecem sementes. As plantas com redução de ambas *OsAPx* peroxissomais apresentam-se mais sensíveis à senescência do que as plantas não-transformadas.

A expressão relativa dos genes *OsAPx* de 4 diferentes linhagens de *OsAPx3/4s* foi avaliada por RT-PCR quantitativo (Figura 13). As 4 linhagens avaliadas apresentaram redução da expressão de ambos genes peroxissomais. O silenciamento pós-transcricional mostrou-se mais efetivo para o gene *OsAPx3*. As plantas *OsAPx3/4s* da linhagem 14 mantiveram apenas 1,5% da expressão do gene *OsAPx3*. Nas outras linhagens, a expressão deste gene foi reduzida de 84 a 94% quando comparada com a expressão em planta não-transformada. A expressão do gene *OsAPx4* foi reduzida cerca de 90% nas 4 linhagens avaliadas. O silenciamento por RNA de interferência dos genes *OsAPx* peroxissomais não afetou significativamente a expressão transcricional dos outros genes da família *OsAPx* (diferença não significativa pelo Teste Tukey HSD, $p < 0.01$).

Plantas *OsAPx3s* silenciadas do gene *OsAPx3*

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

O tamanho das plantas *OsAPx3s* é levemente reduzido quando comparado com plantas não-transformadas de mesma idade e crescidas em igual condição de desenvolvimento (Figura 14). Poucas sementes foram obtidas das plantas *OsAPx3s*, apesar do desenvolvimento inicial normal da panícula. Na senescência, praticamente todas as folhas das plantas *OsAPx3s* estão mortas, diferentemente das plantas não-transformadas de mesma idade (dados não apresentados).

A análise da expressão transcricional de *OsAPx3* por RT-PCR quantitativo confirmou a redução da expressão em 2 linhagens analisadas (Figura 15). Comparando com plantas não-transformadas, a linhagem *OsAPx3s-3* manteve apenas 3% da expressão transcricional de *OsAPx3*. A linhagem *OsAPx3s-26* apresentou redução de aproximadamente 65% da expressão do gene alvo em plantas não-transformadas. A linhagem *OsAPx3s-29* foi analisada 3 vezes, inclusive RNA de diferentes plantas da linhagem foi utilizado para síntese de cDNA desta linhagem. Entretanto, a expressão de *OsAPx3* não foi detectada nas concentrações usuais de cDNA utilizado para as reações de PCR em tempo real. Com o mesmo cDNA foi possível analisar outros genes da família de *OsAPx*. Diante deste resultado, postulamos que a expressão do gene *OsAPx3* na linhagem 29 é inferior à sensibilidade do aparelho. Por outro lado, a linhagem *OsAPx3-41* apresentou elevação da expressão de *OsAPx3* (dados não apresentados).

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

Plantas *OsAPx4s* silenciadas do gene *OsAPx4*

A transformação de calos de arroz com a construção *OsAPx4s* resultou na produção de 3 linhagens, confirmadas por reações de PCR com os primers *Gus* e *Hpt*. As plantas *OsAPx4s* não apresentaram nenhuma variação no seu desenvolvimento até a etapa de florescimento (Figura 16). Assim como as

outras linhagens de silenciamento de *OsAPx* peroxissomal, poucas sementes foram obtidas. As plantas transgênicas na senescência estão mais deterioradas que plantas não-transformadas (dado não apresentado).

5 As 3 linhagens *OsAPx4s* apresentam redução da expressão transcricional de *OsAPx4* (Figura 17). A redução da expressão do gene alvo entre as linhagens variou entre 83% e 96% da expressão observada nas plantas não-transformadas. Pelo teste de Tukey HSD, o silenciamento pós-transcricional de *OsAPx4* não afetou a expressão dos outros genes da família *OsAPx* ($p < 0,05$).

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

30 A APX é uma enzima fundamental no desenvolvimento adequado das plantas. Davletova e colaboradores (2005) mostraram que o nocaute da *cAPx* resulta na redução do sistema fotossintético. Plantas com redução da atividade

de tAPX apresentam maior sensibilidade ao estresse oxidativo (TARANTINO *et al.*, 2005). Comparando cultivares tolerantes à seca com cultivares sensíveis, observou-se que as plantas tolerantes analisadas apresentavam maior atividade total de APX. As pesquisas envolvendo mecanismos antioxidantes mostram a importância da APX tanto em condições ideais de crescimento, como durante períodos de estresses. A presença de famílias multigênicas codificantes de APX em diversas plantas confirma a importância desta enzima para os vegetais (TEIXEIRA *et al.*, 2004).

Apesar de muitos estudos terem sido realizados visando a caracterização funcional da APX, pouco foi desenvolvido em arroz, planta modelo entre as monocotiledôneas. Além disso, o papel de cada isoenzima de APX ainda não foi compreendido. Cada isoforma de APX atua aparentemente de maneira diferente dentro do âmbito celular, uma vez que a expressão e a atividade de cada APx é variável em resposta a diferentes estresses e nas fases do desenvolvimento, como descrito por YOSHIMURA *et al.*, 2000; AGRAWAL *et al.*, 2003; MENEZES-BENAVENTE *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2004 e TEIXEIRA *et al.*, 2006, entre outros. Inclusive, em cada planta a função das isoformas de APX pode ser diferente (RIZHSKY *et al.*, 2002; PNUELI *et al.*, 2003).

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

Foram obtidas plantas transgênicas contendo o inserto de T-DNA para todas as construções "hairpin" desenvolvidas. O efeito do RNAi na expressão do gene alvo foi diferente para cada linhagem obtida, chegando a uma redução de cerca de 97% da expressão do gene alvo em *OsAPX3s*. O promotor de Ubiquitina de milho foi utilizado para dirigir a expressão de todas as seqüências

"hairpin" inseridas na cultivar Nipponbare de *Oryza sativa* L. subespécie *japonica*. A variação na redução da expressão do gene alvo pode ter sido consequência do número de cópias inseridas e/ou do local da inserção do T-DNA contendo a construção "hairpin". Efeito epigenético pode estar regulando a expressão do "hairpin".

A linhagem obtida de *OsAPx2s* não apresentou redução da expressão do gene *OsAPx2*, apesar do T-DNA contendo a construção *OsAPx2s* ter sido inserido no seu genoma, resultado confirmado por PCR. Possivelmente, o T-DNA nesta linhagem foi inserido em região de heterocromatina, o que resultou na inativação da expressão do "hairpin". Além disso, entre os genes da família *OsAPx*, o *OsAPx2* é um dos genes mais expressos em folhas. A pequena expressão do hairpin *OsAPx2s* combinada com a alta expressão endógena do gene alvo podem ter sido a causa da ausência do silenciamento do gene *OsAPx2* nestas plantas transgênicas.

Outro fato interessante relacionado ao grau de silenciamento envolve a linhagem *OsAPx3s-41*, a qual apresenta o T-DNA com a construção *OsAPx3s*, mas foi observada elevação da expressão transcricional deste gene por análises em PCR em Tempo Real. O T-DNA pode ter sido inserido no genoma das plantas desta linhagem em um gene ou região envolvidos na regulação da expressão do próprio gene *OsAPx3*. Como descrito por diversos pesquisadores, os genes *APx* são regulados por diversos fatores ambientais e moléculas sinalizadoras endógenas (ZHANG *et al.*, 1997; YOSHIMURA *et al.*, 2000; ROSSEL *et al.*, 2006; ZAVALITA-MANCERA *et al.*, 2007).

As plantas RNAi obtidas foram avaliadas fenotipicamente em condições ideais de crescimento. As plantas *OsAPx1/2s* não apresentam variação morfológica ao serem comparadas com plantas não-transformadas em condições normais. Entretanto, as plantas *OsAPx1s* com redução da expressão apenas do gene citosólico *OsAPx1* desenvolveram-se deficientemente, como plantas anãs. Outros trabalhos envolvendo mutantes *APx* citosólicas mostraram que a redução da expressão deste gene resultou em plantas com crescimento reduzido (DAVLETOVA *et al.*, 2005; MILLER *et al.*, 2007). Além da

importância da APX no desenvolvimento normal de plantas, o citosol é uma região considerada tamponante dos efeitos oxidativos e modula as moléculas sinais transmitidas dos compartimentos celulares para o núcleo (SHIGEOKA *et al.*, 2002; ISHIKAWA *et al.*, 2005). A redução da APX citosólica pode ter resultado em desequilíbrio homeostático e sinalização de estresse para o núcleo. O acúmulo de H₂O₂ pela redução de *OsAPx1s* pode ter conduzido à indução ou à repressão de genes específicos que afetam tanto o crescimento, como o florescimento das plantas *OsAPx1s*. O H₂O₂ é conhecido como molécula sinalizadora de defesa, além da sua atividade tóxica. O silenciamento de *OsAPx1s* pode ter alcançado nível de H₂O₂ semelhante ao nível de acúmulo desta ERO em plantas em situação de estresse. Desta forma, as plantas reconhecendo uma situação que requer a ativação das defesas, reprimiram genes envolvidos com metabolismo normal, por exemplo, genes de crescimento, e reservaram energia para genes envolvidos com a defesa da planta. O H₂O₂ também pode ter afetado a síntese de hormônios importantes para o adequado desenvolvimento (AGRAWAL *et al.*, 2003). Outro fato relevante que pode ter afetado o crescimento destas plantas é o efeito exercido pelas ERO na biossíntese de lignina (KOTCHONI & GACHOMO, 2006). Miller e colaboradores (2007), utilizando mutantes *cAPx1*, *tAPx* e mutantes para ambos genes detectaram diferentes sinais desenvolvidos pelas plantas de cada mutante. Mutantes para ambos os genes apresentaram florescimento tardio e baixa oxidação protéica durante estresse luminoso o que não foi visualizado pelo mutante *tAPx*, nem pelo mutante *cAPx1*, o qual apresentou redução do crescimento. Diferentemente dos resultados encontrados pelo nosso grupo o duplo mutante manteve a redução de crescimento. O crescimento deficitário apenas pelas plantas *OsAPx1s* e não pelas plantas transgênicas com redução dos dois genes citosólicos pode ser explicada pelo desenvolvimento de diferentes sinais nesses dois tipos de plantas RNAi.

O silenciamento das *OsAPx* peroxissomais, tanto de genes isolados, como o de ambos os genes afetou a etapa de formação das sementes. As panículas foram formadas, mas poucos grãos foram obtidos. A manutenção da

inserção do T-DNA nas plantas da geração T1 ainda não foi analisada. Outro efeito geral da redução dos genes *OsAPx* peroxissomais foi a sensibilidade à senescência. As plantas *OsAPx4s*, *OsAPx3/4s* e principalmente *OsAPx3s* apresentam menos folhas verdes do que plantas não-transformadas de mesma idade. A transformação com "hairpin" *OsAPx3s* também foi a que mais afetou o tamanho da parte aérea, que é reduzido em relação às plantas não-transformadas. Estas análises confrontam o resultado obtido por Narendra e colaboradores (2006), os quais relataram que a APX peroxissomal não seria importante para o desenvolvimento de *A. thaliana*, ao menos na condição aplicada por eles.

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

A redução da expressão de outros genes que não os genes alvos poderia ter sido causada por ação da RNA polimerase dependente de RNA (RDRP). Esta enzima tem a capacidade de utilizar pequenas seqüências de RNA como iniciadores da polimerização do RNA. Desta forma, a RDRP poderia ter ampliado a seqüência de dupla fita de RNA resultante da construção "hairpin", formando assim novos siRNA. Uma vez que estes novos siRNA fossem formados de seqüências conservadas entre o gene alvo da construção "hairpin" e os outros genes da família, o alinhamento dos novos siRNA poderia causar a degradação dos transcritos endógenos dos outros genes, levando a redução do acúmulo destes. As RDRP podem atuar dependente ou independentemente da presença de seqüências iniciadoras (BAULCOMBE,

2004; GAZZANI *et al.*, 2004; MIKI *et al.*, 2005; SCHWACH *et al.*, 2005). Entretanto, a redução da expressão dos genes *OsAPx* não-alvos das construções “hairpin” não deve ter sido causada por efeito das enzimas RDRP. Caso as RDRPs estivessem atuando, ocorreria redução generalizada dos genes *OsAPx*, o que não foi visualizado nas plantas RNAi. Além disso, era esperado que o silenciamento pós-transcricional para o qual foi utilizada a construção “hairpin” para o gene *OsAPx1* levasse ao silenciamento simultâneo do gene *OsAPx2*. Isto porque os 20 nucleotídeos da seqüência da construção *OsAPx1s* estão presentes idênticos e contínuos no gene *OsAPx2*. Entretanto, essa redução não foi observada. Este resultado mostrou a grande especificidade das construções. A redução da expressão dos genes *OsAPx* nas plantas RNAi, principalmente nas plantas com silenciamento de ambos genes citosólicos, pode ser explicada por regulação transcricional induzida pelo aumento de H_2O_2 e desequilíbrio homeostático da célula.

Uma vez que o substrato da APX é uma molécula sinalizadora, a dificuldade de compreender os resultados obtidos é maior. Avaliando o padrão de expressão transcricional das plantas *OsAPx1/2s* quando submetidas aos estresses com alumínio e radiação UV-B podemos afirmar que existe uma regulação dos genes *OsAPx* por efeito do estresse. O padrão de expressão dos genes *OsAPx* variou conforme o estresse que as plantas foram submetidas e a idade das plantas. Desta forma, a redução da expressão dos genes não alvos do silenciamento por RNAi pode ter sido causada por efeito do aumento dos níveis de H_2O_2 e sinalização por parte desta ERO ou de outras moléculas sinalizadoras. O que corrobora esta hipótese é que a variação da expressão dos genes não alvos ocorreu com maior intensidade em plantas silenciadas nos genes citosólicos. Como já descrito anteriormente, o citosol é capaz de modular os sinais para o núcleo. Pouco se conhece a respeito das propriedades detoxificantes do núcleo, que deve apresentar fatores de transcrição sensíveis ao equilíbrio redox (MITTLER, 2002). Vale ressaltar que análises confocais da localização de *OsAPx1-GFP* em células BY-2 de tabaco revelaram a possibilidade desta enzima estar também localizada no núcleo

(TEIXEIRA, 2005). Uma vez que o H_2O_2 pode ultrapassar membranas (HENZLER & STEUDLE, 2000), o efeito do acúmulo desta ERO nos peroxissomos nas plantas silenciadas para os genes *OsAPx3* e *OsAPx4* pode ter sido reduzido pela ação das APX citosólicas, caso a atividade das próprias
5 enzimas peroxissomais fossem ineficientes. Sendo assim, seria mais difícil o aumento de H_2O_2 nos peroxissomos ocasionar sinalização para modificar a expressão gênica.

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

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

componentes antioxidantes, resultando em maior sensibilidade nessas situações do que plantas controle.

Estudos mostraram que a superexpressão de enzimas antioxidantes combinadas é capaz de aumentar a tolerância a diversos estresses (YABUTA *et al.*, 2002; BADAWI *et al.*, 2004; ROSSEL *et al.*, 2006; TANG *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2007a; LEE *et al.*, 2007b; LU *et al.*, 2007). Frente aos resultados obtidos sobre as APX citosólicas e peroxissomais foi observado que a alteração da atividade de cada enzima APX é capaz de provocar diferentes efeitos nas plantas.

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

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

Listagem de sequências

Sequências genômicas e cDNA dos genes OsAPx e alinhamento dos "primers" utilizados nas construções "hairpin" e para análise da expressão transcricional por RT-PCR quantitativo.

OsAPx1

Sequência Genômica TIGR: LOC_Os03g17690

10 ATGGCTAAGAACTACCCCGTCGTGAGCGCCGAGTACCAGGAGGCCGTGCGAGAAGGCCAGGC
AGAAGCTGCGCGCCCTCATCGCCGAGAAGAGCTGCGCCCTCTCATGCTCCGCCTCGCGTAA
GCCGTCGCCCTCGCACTCGCTCGCTTCTAGGTTTTGTGTAGAGGCGGATTTCCGTAGACTGAT
CCGTTTTTTGTGGAGACGGATCGCGCAGGTGGCACTCGGCGGGGACGTTGACGTGTGCTCG
15 AAGACCGGGGGCCCGTTCCGGGACGATGAAGACCCCGCGGAGCTGTGCGACGCCGCCAACG
CGGGGCTGGACATCGCGGTGCGGATGCTCGAGCCCATCAAGGAGGAGATAACCACCATCTC
CTACGCCGATTTCTACCAGGTTCCGCCGAGCCCCGATAGATCTGGATGGACGGCCCCGAT
CTGGTCAAACGGACGTGGTTCTGATGTTTTTTCCCGTTGTTTTGCGCAGCTTGCCGGAGTT
GTGGCCGTGAGGTGTCCGGTGGACCTGCCGTCCCCTCCACCCAGGAAGGGAGGTGAGATT
TCCTATTACCTTTCAACTCTTGGGGTTTTTCTCAGGGTTCTAGTTAGGCCTTGATATGGCAGT
20 GGTAAACTGGATGGCGTGTGGATTGTTTTGTGATGCCACGAGATTAGTCGTAATTTGTTAGT
GCTCCATTGATGTGTGTGCTTTTCATTTGIGGGGACTGGGGGTTGGTGGTTCCTAGAGAGTAG
ACAAAGTGATCACCCTAATCTAAGGCCAGCAGTATAATAATATTTAAACAGTACGGACTTT
TCTATATTATATACCCGGATAATACCGTCAAATTGGGTTTGTTCGATTTCTTGTGGTGGGTC
GGCGTTACTTGACATCCTCTAGATCTAGAGGTGGTAAATATCCGTGACCTCATTACATTTT
25 CGTAAGACCTTGTTTATTTACCATAAACATGCTAATTGTTATTTTTTAGTTATTGTTGGTTCAT
GTGTTTTGTGTCAGTTGAGTCACATAGGATTCATTTTCATGCATGCTGTATGGTGTGAAGTTG
TTATCCATTGACATAAGGATATTATTTAAGGATGTCGCCTTATCCTTTTTCTTTGTAGTC
TGGCTATTCTCAAAGTAGTCACTGATTTACCATGGTTGTTTGCGGCATTTCCTTTCAGGGT
TTGATAGTTACTGATCTTTCAATTTATCATTTTTATTTTTACTCAGGATAGTAGTTCATC
30 CTAATCGATGTCATACTCTAAACCATGACAAATAACAATTATTTTCTGAATTAATGGAAGA
AGCCTTGGGGACCTGGAAGAAGCCTTGGGGACCGGGTGTTCCTTCTATGCATGATA
TAGTTTGATCTGTTGGATTGTGCCATGTAGGATATTTGTTGTGCTTTGTGAATATAAACTTAA
GAAAGCATCCATTATTTACAAGTCTAGTTGGTTCAGATAAAGTATATTAGGGCCTCCCACT
TATTGCATTGACATAAAATGATAATTAGGGGTTCAATCTGAAGGCAGTTGGAAGCTTAATG
35 AAAAAACAGTGGGCCGATATATATCTATATGTTATGTTTTAGGAAACTTTAGAAAGGTGACT
TGGTGTCTGTTTTAGGATATAATAACTGTTATGGATATATCTTTTTTATAAATACATAATGT
TCAGTAATTATTATGCACCTTCAACAATATCACCGATGATAGTAATATATATCATATATGTAA
CATTATACAGTGCTTAAAATTTGCTTGTGCATATCTGGCTCATCTTTATATTTATTCTAAAAT
GGAGAGATGATTAAGTGTTTTTTATGTTCCATTTTATATTCATTGTGTTGTTAATTGAGATTG
40 TTTTCATCCTTCCCTTGACCTTTTGACAGGACAAACCTGCACCCCCACCTGAGGGCCGTCTTCC
GATGCTACCAAGGGTATGTTGCCAGTTTACACTACTAGTCTCTTCCAGGAACTATAGAAACA
TTCACCACTATTGCCATAAAAGAAACCCTTGCAAATAAGTCATCCTTTAAAATGTTTTGTTT
CTGCAATAGTTGAGGTGTTATTTCTGTGTAGCACATCTAAAATGCTTAGTTATGGTAGAAGTT
TTCCCACTGCACACTTGACAAATGATTCCTGTGTTGTTGTAGGCATGTTGATTTTTCTGCAT
45 GCTTCATTTCTGATATGATCCTGCTTTGACCTTGTCTAGTAAACCTCATGTAAGCACCATT
GCTTACACTTGAGCTTGATTGCTTTACCAGTTCTGACCACCTAAGGCAGTCTTCGGTGGC
CAGATGGGCTTGAGTGATCAGGACATTTGTTGCCCTCTGCGGGTTCACACCTGTTAGTTT
GGCTATTAACCATTGTATGCCTCTGCAGTATGTAGGAGTACATGTTCTAATGTCGGATTCTG
TGCTTTGTTCTGCAGGGAAGGTGCCACAAGGAAAGATCTGGTTTTGAGGGACCTTGGACAAG
50 AAACCTCTGCAGTTTGACAACCTTACTTCACGTAAGCGATGTTACGAGTGGTTGAATTTG
TTCTATGCTGAACAAAGTTGGTAAACAAAATGTTGAACTCATCTCTCCGCGACGATTTTAA
AGGGAGCTTCTGAGTGGTGAACAAGGAGGGCCTTCTTCAGCTTCCCTAGTGACAAAGCCCTGCT
GAGTGACCCTGCCTTCCGCCCCACTCGTCGAGAAATATGCTGCAGTATGTCTCTATCAATCAT
CATCTTGTGTTCCACGTTTTGCATCTTGTGTTCTCGTTTTGCAGAGATATGCCAGAACATGA

TACTGATTGTGTTTTTTTTTCCCAATTCTGCTAGGATGAGAAGGCTTTCTTTGAAGAC
 AGCTCTCCGAACTGGGGTGAGTAATGGTTTGTCAATCCATTATCGT
 GTTATCTTTCATGACAACAAGGTCATGGTAGCTAATTGTACTCTTGTGATTCAGGTTGCTG
 ATGCTTAA

5

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

10

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

TCTCCTCCTCCTCCTCGATTCCGAGCTCCACCCGCAGCCATGGCTAAGAACTACCCCGTCGTG
 15 AGCGCCGAGTACCAGGAGGCCGTCGAGAAGGCCAGGCAGAAGCTGCGCGCCCTCATCGCCG
 AGAAGAGCTGCGCCCTCTCATGCTCCGCCTCGCGTGGCACTCGGCGGGGACGTTTCGACGTG
 TCGTCGAAGACCGGGGGCCCGTTTCGGGACGATGAAGACCCCGGGGAGCTGTGCGACGCCG
 CCAACGCGGGGCTGGACATCGCGGTGCGGATGCTCGAGCCCATCAAGGAGGAGATACCCAC
 20 CATCTCCTACGCCGATTTCTACCAGCTTGCCGGAGTTGTGGCCGTCGAGGTGTCCGGTGGAC
 CTGCCGTCCCCTTCCACCCAGGAAGGGAGGACAAACCTGCACCCCCACCTGAGGGCCGTCTT
 CCTGATGCTACCAAGGGTTCTGACCACCTAAGGCAGGTCTTTCGGTGCGCAGATGGGCTTGA
 TGATCAGGACATTGTTGCCCTCTCTGGCGGTCCACACCCTGGGAAGGTGCCACAAGGAAAGAT
 CTGGTTTTGAGGGACCTTGGACAAGAAACCCTCTGCAGTTTGACAACCTTACTTACCGGAG
 CTTCTGAGTGGTGACAAGGAGGGCCTTCTTCAGCTTCTAGTGACAAAGCCCTGCTGAGTGA
 25 CCCTGCCTTCCGCCACTCGTCGAGAAATATGCTGCAGATGAGAAGGCTTTCTTTGAAGAC
 AGCTCTCCGAACTGGGGTTCGCTGATGCT GAGGTTTCTAG
 TCTACTACTGCTAGTACATTGCCCGTGGTACTCTTGTTTTGCATCTAGGCTAGGGCCAGTGTG
 AACCAGCAGACTACCACTGTGAGTCGCCTCTGTAATAAAATTTGTTTCGGCCTATGGCATCCT
 CAGTACGTTGCAATGTCTCGGTGGGCTGTTATGCTCAACTGCAATGCTGCATCCACTGAAA
 30 CCTCTTTCTAGA

35

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

Construção *OsAPxIs*:

40

"Forward": AAAAAGCAGGCTCCC

"Reverse": AGAAAGCTGGGT

45

qRT-PCR: (seqüências de "primers" sobrepõem-se aos utilizado na construção *OsAPxIs*)

"Forward": CTCGAGCTACAAGGAGGCCACCTCA

50

"Reverse": GGTACCTCGAGCCGCATTTACATACCAACACA

OsAPx2

Seqüência genômica TIGR: LOC_Os07g49400

5 ATGGGCAGCAAGTCGTACCCGACGGTGAGCGATGAGTACCTGGCGGCCGTGGGCAAGGCGA
AGCGCAAGCTCCGCGGCCTCATCGCCGAGAAGAAGTGCGCCCACTCATGCTCCGCCTCGCG
TAACCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTACTGATTAATTTCCAGAAGATAGAGTAGGAGGAGTAGAT
GTTGAATTGCAGTGGCTGGCTGGCTGCAGGTGGCACTCTGCTGGCACCTTCGATGTGTCGTC
GAGGACCGGCGGGCCCTTCGGCACCATGAAGAACCCCGGCGAGCAGTCCCA ██████████
 10 ██████████ CATCGCCGTCAGGCTTCTCGACCCCATCAAGGACCAACTTCCCATCCTCT
CCTACGCCGACTTCTACCAGGTAAGGTTCACTTCCCTCCCTCCTCCCTTCTTCTCAACT
CATCAACCTCTTAATTGGAGTCTCTCCCTCTCTATTGGCAGCTTGCTGGCGTTGTGGCCGTCG
AGGTCACCGGCGGACCTGAGGTCCCCTTCCATCCGGGCAGGCAGGTCAGAATCACATTTCC
CATCCCTAAACCCTCTCCCTCTCTCCCCCTTCTTCTTCTTCTTCTGGTAGATGCAAATGG
 15 TATTTTTCTTAAGTCAATCTTTTCTTTCGTCATCTTGTACGCCGCTGTTTCCCTTCCCTGAATT
CTCCACTGTCTTGTGAATGTTGATGATGTGATGTGTTGTTTCTAGGACAAGCCTGAGCCTCC
TCCTGAAGGCCGTCTTCCCTGATGCCACACAAGGTATTAAGATTTCTCTGTATTAAGTTACCC
CTATGACAATGCATTTCCCAATGTGTTGGTGATTAATTTCTAGATCTATGACCAGCATTG
TATGTGCTACTGATGGAGTAGTTCATATTGCAAGTCCATTACCAGAATCTTTCATGCTTAAG
 20 TAAGTTGTGTAACCTACATAAGACTAAAATTTTCCAACCCTGTTTATGCAAACCACATTACTA
AAGTTTGTGTTGTTCTGTTTATTCTTCTTCTTATATGGAGCATAACATGTTACCTGTGTGT
TCTTTAATTAACAGTGTGCCAATTTGTGGATGCGAGATAACTAATATGTCATGGTCTTCTGGC
TGTTGGTCCAGGTTCTGACCACCTAAGGCAGGTCTTTT ██████████ AC
AAGGACATAGTTGCTCTTCTGGTGGTCACACCCTGGTTGGTACACTTGTGCAATTGCCCTAG
TGTGTTTCTCATATCTTGTAAACCGGAAGGTTATTTCATGCAGCTTCACTTCTCTGTAGG
 25 GAAGATGCCACAAGGAGAGATCTGGCTTTGAGGGAGCCTGGAGCTCAACCCCTTGATCTT
TGACAACTCTTACTTACAGTGCCTGATCTCTGATTCTTTTTAAAGATGCATCCTGTCTGTTGA
TAAACAGCCAGCCACAGCTTGTTCCTTGTATGCTAAAGAATGAAAACCAAATCTCCTCTC
GATCAACAGCGAGCTTGTGAGTGGCGAGAAGGAAGGCCTTCTTCAGCTGC ██████████
 30 ██████████ GGCTGACCCAGCCTCCGTCCTACTGGTGGAGAAATATGCTGCGGTACACCCCTT
GATCCTTGCAATTTTTCTCTCGTCTTCTTCTAAAGAGTTGTTTTTTTTAAATAAAAAGAAAT
AAGAGAAATGGATCATCGTTGATCTCTTAAAAAGTAGATGATTGTTGCCTGATATGTAGGAT
GAGGACGCCTTCTTTGCGGATTACGCCGAGGCCACCTCAAGCTCTCTGAACTGGGGTAAGG
GATGCAACTGGTGTGCTTGTCTGTGATGCGTTATTGGAGTGCTTTGTGCCAGAGTTTCACTAA
 35 TTATTGTTGTTTGTGGGTTTCAGATTTGCTGAGGAA ██████████

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

40 **Seqüência cDNA completo (Número de Acesso NCBI: AB053297):**
AGGTGAGTTGAGTTGGGGATTGATTGATTGATTTCGGATTGGGAAGAAGAAGCAGGGGA
GCATGGGCAGCAAGTCGTACCCGACGGTGAGCGATGAGTACCTGGCGGCCGTGGGCAAGGC
GAAGCGCAAGCTCCGCGGCCTCATCGCCGAGAAGAAGTGCGCCCACTCATGCTCCGCCTCG
CGTGGCACTCTGCTGGCACCTTCGATGTGTCGTCGAGGACCGGCGGCCCTTCGGCACCATG
 45 AGA AACCCGCGAGCAGTCCCA ██████████ CATCGCCGTCAGGCTT
CTCGACCCCATCAAGGACCAACTTCCCATCCTCTCCTACGCCGACTTCTACCAGCTTGTGGC
GTTGTGGCCGTCGAGGTCACCGGCGGACCTGAGGTCCCCTTCCATCCGGGCAGGCAGGAC
AAGCCTGAGCCTCCTCTGAAGGCCGTCTTCTGATGCCACACAAGTCTGACCACCTAAG
GCAGGTCTTTT ██████████ ACAAGGACATAGTTGCTCTTCTGGTGGT
 50 CACACCCTGGGAAGATGCCACAAGGAGAGATCTGGCTTTGAGGGAGCCTGGACGTCCAAC
CCTTTGATCTTTGACAACTTACTTACCCGAGCTTGTGAGTGGCGAGAAGGAAGGCCTTCTT
CAGCTGC ██████████ GGCTGACCCAGCCTCCGTCCTACTGGTGGAGAAAT
ATGCTGCGGATGAGGACGCCTTCTTTGCGGATTACGCCGAGGCCACCTCAAGCTCTCTGAA
CTGGGATTTGCTGAGGAA ██████████ GAAGCCTTTAGAGAGCGGGATATCCGCAAAGATTAATGC
 55 ██████████ AGAGTCAGTACGATCAAGACTGTCGTGGCGGTTGTAATAAA

AATTTTGCTAATTATAAATGATTAAATGAAATGAGCGCTGAAACCTTCCAATATGTTGTATG
 CACAAAGTTCAGATGATACAATTAATTCGAAATTTGTTTTCTGGATAATTTGCTTCAAAA
 ATGTCAAAGGTATTTAGTTTCTTGTACTATATTTACTTTTTGAAAAGGTGCTGCGCATCTG
 AGGGAAGTCTTCTACAGGATGGGCTTATCAGACAAGGACATAGTAGCACTCTCAGGCGGCC
 5 ATACTCTCGTATGCAACATCATCTTTCTACTGGTGTATATAATATCAACTACTATTTTCCA
GCTAAATTAGAGATCATGTTCTGAATAGTTCATTTTCAGGGGAAAGCTCGTCCC ██████████
 ██████████ GCCTGGACAAAGGATCCACTGAAATTTGACAACCTCCTATTTTCATGTAA
 GATTAATATGACTTGTCCCTCCACAGAATTAATTATGATGGTGGCTTGGACAAAGAATCCT
 CCGAAATTTGATAACTCCTATTTTCATGTAATATTAATATGACTTATCCATCTATAGAATTAA
 10 TAAATATCACCATTTGCTTCAATGCAGTGAGCTTCTGAAAGAGAATTCAGAAGGGCTTCTG
AAGTTGCTACTGACAAGGCTCTTGTGAAGATCTACATTCCGCCGCTATGTCGAACTATAI
GCCAAGGTACATCGCATTATATCCCAAATCTTTTCTATTCACTGTAACATTTTCAGGTAGCTT
 ATCAGGATGGTAATTAATTTTTTTCTTTTCTGAAAATCGTAGTGCTTCTGTAATGTATGTT
 TTCCTTTGTTATGGTAATCACAATAGTTTGTAACTATAAACTTTCTGATAGATTGCATTAGT
 15 ATTGCACAAATAGAAACCTAACCGAATGATGTGTGCAATGAGCAATTGAGCATTCTCTAGT
 TAGTAGTTAATGAGTTCTTGATTGCTAACAAATAATTTGTATTTTCTTTGTAGGACGAAGAT
GCATTTTTTCAGGGACTATGCAGAGTCGC ██████████ GTTCACGCCTC
 CTCGCTCTGCATTCATCTACAAATCATGCCAGAAACCAAAGTCCCTGTTGATGCAAACCTGCA
 GCTGGGGTTGCAGTTGCTGCTGCAGTTGTCGCATGGGCTTACCTCTGTGAATCCAACAAGAG
 20 GCTTGGCTAA

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

25

Seqüência cDNA completo (Número de Acesso NCBI: AY382617):
 30 CTATCACCTCTCCTCGGATCGTCAGCAACAGCGGCGCGATGTGCGGCGGCGCCGGTGGTGGGA
 CGCGGAGTACATGGCGGAGGTCGAGAGGGCGCGCCGCGACCTGCGCGCCCTCATCGCCAGC
 AAGAGCTGCGCTCCCATCATGCTCCGCTGGCGTGGCACGACGCCGGCACGTACGACAAGG
 CGACGAAGACGGGAGGGCCCAACGGCTCCATCAGGTTCCCGCAGGAGTACAGCCACGCCGC
 GAATGCGGGCATCAAGATTGCTATTGATCTGCTAGAACCGATGAAACAGAGGCATCCCAAG
 35 ATTACCTATGCTGACCTGTATCAGCTTGCCGGAGTTGTTGCCGTTGAAGTCAACGGTGGGC
 CAACTATAGATTATGTTCTGCGAGGAGGATTCTTCAGATTCCCAGAGGAAGGCCGTTG
 CCAGATGCTAAGAAAGGTGCTGCGCATCTGAGGGAAGTCTTCTACAGGATGGGCTTATCAG
 ACAAGGACATAGTAGCACTCTCAGGCGGCCATACTCTCGGGAAAGCTCGTCCC ██████████
 ██████████ GCCTGGACAAAGGATCCACTGAAATTTGACAACCTCCTATTTTCATTGAG
 40 CTTCTGAAAGAGAATTCAGAAGGGCTTCTGAAGTTGCCTACTGACAAGGCTCTTGTGAAGA
 TCCTACATTCCGCCGCTATGTCGAACTATATGCCAAGGACGAAGATGCATTTTTTCAGGGACT
 ATGCAGAGTCGC ██████████ GTTCACGCCTCCTCGCTCTGCATTCAT
 CTACAAATCATGCCAGAAACCAAAGTCCCTGTTGATGCAAACCTGCAGCTGGGGTTGCAGTTG
 CTGCTGCAGTTGTCGCATGGGCTTACCTCTGTGAATCCAACAAGAGGCTTGGCTAATTTAATT
 45 TGCATCGATCACAATGATCGTTATTTCTGCTCAACCACTAATGGCTGTACAATAAGAAGGTA
 CTCGATTGGAACATTTGGATGATGTATATGTGTTTGTGGTATATATATGTGAGTGCTGCTAA
 GTCTGCTATGTTG

50

Seqüências de “primers”: (A seqüência realçada é a região que se alinha ao gene *OsAPx*, a outra região alinha-se ao vetor, em parêntese encontra-se a seqüência inversa complementar do “primer reverse”)

55

Construção *OsAPx3s*:

“Forward”: AAAAAGCAGGCTCCC [REDACTED]

“Reverse”: AGAAAGCTGGGTC [REDACTED]

5

qRT-PCR: O “primer Reverse” sobrepõe-se ao “primer Forward” da construção *OsAPx3*.

“Forward”: GGAGTTGTTGCCGTTGAAGT

10

“Reverse”: ACCATCAAATCCTGATCTTTC

15

OsAPx4

Seqüência genômica TIGR: LOC_Os08g43560

20

ATGGCCGCCCGGTTCGTGGACGCCGAGTACCTCCGCCAGGTCGACAGGGCGCGCCGCCACC
TCCGCGCCCTCATCTCCTCCAAGGGATGCGCGCCCATCATGCTCCGCCTCGCGTACGTACCTA
 CCGGCCTACCCCATCTCCTGCTCCTCTAGAACCCTCCCCTAGTTCCTAATCCTTGTGATG
 GATTCGCGCGCGGTGGCGAGGGAGGGAGCTCTCGTGTGTTTGGATTTGGAGCCCGCTCGGC
 TCTGCTTGCTCGAGTGGTGGGATGAGTTACTGCTGGTGGTGGTGGATGGGTCGCTTGCGA
 TTGCGAGACTGTATGATTGGGTTTGGTTAGTTGCTTGCGGCGGGTACCTGCGCTGGTCCGTG
 25 GCGTGGCTGTTGGGCGAGGCAATTCGACGAACACCTTGAGTGCCTGCGCGCCTGCTTTGGAT
 GGCTCCCAGATTTGGTTTGGATTGTGTGACTGCGCCTTTGGAATTAACGAGGAACGGCGGAC
 GATGTTTAGTTCGCTAGTTCACATGTAGAGTGCACGCGTTTTTCTGTTGATCCGTTGGTTCTC
 TCATACTAGTCAGGAACTAGCAACCTAGCAGGGGAGAGCGAGCATTTTTAATCACTCCCA
 TATCCGTCATAACGGCAATATCGCAGGAAGCTAAGACGAATTTCTTATTTCTGTCTATAGTA
 30 GGTGTTCCACTCCATGAGCTTCGTGTTACATTTGTGGAGCTGATGAGAGACCAGTGTACAA
 ACTGGAACAAATAAGTGATGTTTATTATCTAAAAAAGGGGATGTTTGCCTACTGCTGCA
 AATGTTCTATGTATATTGTAATTACGAATGG

35

ACTCAGAAGAAGCATTACCATTTAACGCACCATTACAGATAGTGCAGCGTGTATTTGCTAAT
 TAATTAGTACTTTATATATGGAATTGTGATTTTTTTATCTTATATGTTGTATACAGTGTCTT
 CTGTAATGTAATGAGTTTTCTCATTATCATGGAGGATATTCTGCGTGTCTTTGGATTAC
 TCTTGGACTAAAACCTTAGTTCCTGTGCACTCCCTTGACAGATGGCATGACGCGGGCACTTATG
ACGTGAACACAAAACTGGTGGTGCAAATGGTTCAATTAGATACGAGGAAGAGTACACTCA
CGTTTCAAATGCTGGTCTAAAGATTGCTATTGATCTTCTCGGTATGTATTGTTGTCCCAAT
 GTGTTCTAGATGATTAGACGAAAGTAGCTTTCCTTTCCCAATTGTCAGAATGGCTCTAG
 40 TTCCCTTAAACCACTCATCAGCTATATGATTGATGCCTCTTAAGAAATCAATTTGAGTTTTT
 TTGTCAGTTTTCTCAAATTTCTTTTCTATTGTTTTGGGTTTTACCTTGATCGGACTACA
 AACTAACTCTTTTTTCTCTAATTCGGGGATCAAATTTTTGGGAGAAATAACTAAAAAAC
 AAGAACTCCCATATTTTTGCAACTATTCTCAATGGTGTGTCAGTACTCACCCTTTCTCTG
 TACAATTGCATTATTTACCTGTTCCACGTTATCTAGTTTATTGTTATATTGTCACCTTATTAG
 45 TGATGAAATAAATCGAATGATTACTTATGCTTCTCCAATTGTCTTTTACTGTAACAGAGCCTA
TTAAAGCCAAGAGCCCTAAGATCACATATGCTGACCTTTATCAGGTAATTAGCGTTGCTTG
AATTGGTTCTTGTGCTGCCAACTTATTATAAGAGTGCCTTGATACTGTGACATCTTTTTTTTT
CTTGTGCGACATTTGATCTTTTTTATCTTATCGATTACTGTGTAATTTTAAGATCCTAACTA
GATTTTTCTTACAGCTTGTGGAGTTGTTGCAGTTGAAGTTACTGGGGTCCAAGTGTGAGT
 50 TCATTCCTGGAAGACGTGTACGTGAAATAACATTTCTTATGAATGGATGCATCTTTTATTGA
TTCACACTTATTAAGTTCTTTTACCTGAATCAGGATTCGTCAGTTTGCCCCGTGAAGGGCG
TCTtctgatgctaagaagGTAATTGCCACAACTATTCTTGAAGTGGTCTACCTTTTCTTTTGTCA
 TTATAATCATGCTTCCCTGACTCCTAGTGTGTTGAAGCAATGAGTCAAAATATGTGTTAGTATTC
 TACATGTATCACATTTAGTCCCATGCATTTCTCCTGTACTTGTCTGCTAGTACTCATGTTCTGG
 55 CATTTAGTACTTAGTGTGCTTGAGACAACCCAGTTCATGCAATACATACCGTAATATGTAC

ATTATCTTAAACACACATACATCTCTTCATAGATGGGAGCCTCGTCTTTTCATTTATCTTATAT
 TCCTGCATATCTGGTATAGTTGTCATTTAGGTGTCATACCAGCAGGTGCTGTTGTATGTCTGG
 TAATTTGTTTTATGTTATTTATCTGTTTTCTATTCCTTCTGCCGAAGTCTGTTTTCTTTCTTA
 CATTACTGGGATGCAAGGTGCCAGTTCCTATTTTAGTATTTAATAACTGGTGCCAGAATCC
 5 TGTGTTGATATGTATAATCGTAATCATATATCTATTTTTATGGGGTATATCTGCATTTTATCT
 TTGTTTCATGAGCAGGTGCACTGCACTTGAGGGACATCTTTTACCGGATGGGCTTATCAGAC
AAAGATATAGTAGCTTTATCTGGGGGTCACACTCTGGTAAATGCTCTAATTAATGTAGAATT
TGTGTAATGGTAATCCTGATTCTTCATGAGAAGCACAGTTTTAACAACCTCGCTTTATACTTCA
 10 AGGGAAGGGCACATCCTGAAAGGTCTGGATTGAAGGCGCATGGACTCAGGAGCCTCTGAA
GTTTGACAATTCGTACTTTCTGTAAGTTGAATACAAAACCTGGGTCATTTACGTACTAATTCTG
GGCACTAGATTTGAGGTTAGAAGATAACAGTGTAATTTTTATTTAACTGCAGTGAGCTACT
GAAAGGGGAATCTGAGGGGCTTCTGAAGCTCCCAAC ██████████ atccTTCATTTA
GACGCTATGTGGATCTTTATGCCAGGGTAAAAGGATCTTTTATATATATATTTTTTTTTCTAT
 15 TCCTTGCACCTAAAACCTCCCCATTTTATATGCCCTTTCATCCATTTTTTAGGACTATAGGACC
ATTAACAAAATATAAAGTATTTGAATTTGTTAGTTGAAAATGCAATTAATAGATTTATTTATT
GTCAAATATGATTTTCGGAGCATTATATTTTACAACCTTTACTGCTATATAATTGGAAGTGAA
TAATTTTCAAATGTACAAGAAGTGAATTTTCATGCCGACGTACTATGCCTTGCGGTG
 20 CTCCATAATATAAGTTTTACATTCAGAACCATTTCTTCTGTTTCATATGGCAGGATGAAGACAC
CTTCTCAAGGACTACGCTGAATCGCACAGAAGCTTTCTGAACCTGGCTTCACTCCACGGA
GCAGCGCCCTGCATCTACGAAATCTGATCTTTCAACTGGTGCTGTACTCGCACAGAGTGCT
 25 GTCGG ██████████ TAGTTATCGTGAGCTACCTATACGAGGCTTCTAAGA
AGAGCAAGTAA

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

25

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

GAGTGAGTACTAGTCACACCACACGCTTGGCTTGACGCCGACGCGACGCCACGCCATGGCCG
 GCCGCGCCGATCTCTAGGGCTTCCAACCTCGCCGCGACGCGACGCCACGCCATGGCCG
 30 CCCC GGTCGTGGACGCCGAGTACCTCCGCCAGGTCGACAGGGCGCGCCGCCACCTCCGCGCC
 CTCATCTCCTCCAAGGGATGCGCGCCATCATGCTCCGCCTCGCATGGCATGACGCGGGCAC
 TTATGACGTGAACACAAAACCTGGTGGTGCAAATGGTTCAATTAGATACGAGGAAGAGTAC
 ACTCACGGTTCAAATGCTGGTCTAAAGATTGCTATTGATCTTCTCGAGCCATTAAAGCCAA
 GAGCCCTAAGATCACATATGCTGACCTTTATCAGCTTGCTGGAGTTGTTGCAGTTGAAGTTA
 35 CTGGGGGTCCAACCTGTTGAGTTCATTCTGGAAGACGTTGATTTCGTCAGTTTGCCCCCGTGAA
 GGGCGTCTtctgatgctaagaagGTGCACTGCACCTGAGGGACATCTTTTACCGGATGGGCTTATC
 AGACAAAGATATAGTAGCTTTATCTGGGGGTCACACTCTGGGAAGGGCACATCTGAAAGG
 TCTGGATTTGAAGGCGCATGGACTCAGGAGCCTCTGAAGTTTGACAATTCGTACTTTCTTGA
 40 GCTACTGAAGGGGAATCTGAGGGGCTTCTGAAGCTCCCAAC ██████████ atccTT
 CATTAGACGCTATGTGGATCTTTATGCCAGGATGAAGACACCTTCTTCAAGGACTACGCT
 GAATCGCACAGAAGCTTTCTGAACCTGGCTTCACTCCACGGAGCAGCGGCCCTGCATCTAC
 GAAATCTGATCTTTCAACTGGTGCTGTACTCGCACAGAGTGCTGTGCGG ██████████
 ██████████ TAGTTATCGTGAGCTACCTATACGAGGCTTCTAAGAAGAGCAAGTAAGATTGCT
 45 ATGTTCTTCATCAGCATGGCCTCATAGTAAGTATCAGGGTCAAATAACAGAATTCTAGTGAT
 GATCCAGCCATACGAACACTTCCTTCATGTCTACATATACCCTATCAATATTTTCATGGGGAAT
 TATATGGAGATGACATAGCTTCACTATTTAAAAGCACTTTGGACATATATTATCCGCTTCT
 GTGTGCTCTCTAATATCTACAAGAACAGTGGTTTGTGTCCT

50 **Seqüências de “primers”:** (A seqüência realçada é a região que se alinha ao gene *OsAPx*, a outra região alinha-se ao vetor, em parêntese encontra-se a seqüência inversa complementar do “primer reverse”)

Construção *OsAPx3/4s*:

“Forward”: CACCTctctgatgctaagaag

55

"Reverse": **ggatcttccaacaatgct**

Construção *OsAPx4s*: O "primer Reverse" sobrepõe-se ao "primer Reverse" da construção *OsAPx3/4s*.

5

"Forward": AAAAAGCAGGCTCC [REDACTED]

"Reverse": AGAAAGCTGGGTC [REDACTED]

10

qRT-PCR: O "primer Reverse" sobrepõe-se ao "primer Reverse" da construção *OsAPx3/4s*

"Forward": CTCGACTGACAAGGCATTGTTGGAAG

15

"Reverse": GGTACCTCGAGCAGCTGCAGCAACAGCTACC

OsAPx5 (Número de Acesso NCBI: AK073910)

20

Seqüência cDNA completo:

TCCCCCCCCCCCCCAAAACCCCTTCCTCTCCCCTCGACTCCGGCGCCGACATGGCCGTCGTG
 CACCGCATCTCCGCCGCGGGCTCTCCGCCGCTCTCCCCTCCCTTCTCTCCGCGGCCTCCTC
 CTCGTCTCCCCTCAGGAGCTCGGCAGGCGTCCGGCGAGCTCGTCGTCGTCGGCGGCGGGCGGC
 25 TGGCGGGGACGTGGAGGCTGAGCTGCGCGCCGCGCGGGAGGACGTCAGGCAGCTGCTCAAG
 TCCAACCCCTGCCATCCCATCCTGGTTCCGGTTAGGGTGGCATGACGCTGGCACTTACGATAA
 GAACATCACTGAATGGCCAAAGTGTGGTGGTGCGAATGGTAGCTTGAGATTTGGAGTTGAGT
 TAGTACATGCAGCTAACAAAGGCTTCTGAAGGCGTTATTCTTGGTCATTCCCATCAAGAGC
 AAGTATGCAGGTGTCACTTATGCAGATATATTTCAACTTGCCAGTGCTACAGCCATTGAGGA
 30 AGCCGGTGGCCCCAAGATCCCCATGATCTATGGAAGGGCTGATGTTGCTGATGGTGAAGAAT
 GCCACCTGAGGGGAGACTTCTGCTGCTGACCAACCTTACCTGCTGAACACTTGCAGAGAA
 GTATTCTACAGAATGGGCCTGAGTGACAAGGAAATTGTTGCGTTGTCAGGAGCTCATACT
 TGGTCGAGCTAGACCAGAGCGTAGTGGATGGGGTAAACCAGAAAACAAAATCACTGAAAAT
 GGGCCTGGTGCTCCTGGAGGGCAATCTTGGACATCTGAGTGGCTCAAGTTTGACAACAGCT
 35 ACTTCAAGGAAATCAAAGAACGCCGAGATGAGGATCTTCTAGTTCTCCCTACTGATGCTGTG
 CTCTTTGAGGACTCATCATTCAAGATCCATGCTGAAAAGTATGCTGAGGATCAGGATGCATT
 TTTCAAGACTATGCTGAAGCTCATGCCAACTGAGCAATCTTGGGGCAAAGTTTGATCCT
 CCAAAGGGTATTTCACTTGAATAGCTGGCGTCAGCTGCCGATGAACTGCATTTTGGCGAGTG
 ATAAACAAGATAATACCTTGTGTTGTTCTTGCTACTATAGAGCATATTCTGGTTTTACTACCCA
 40 TCCAGAAATTTAACTTATTGTAATGTGATGCTGGTGTGTATTGAGCTGTGTTACTGCTT
 GCCATCTTATCTATTGACTATATTATAAAGATAGCTCGAAAAGAGCAACCAAATTTGTTT
 AGGTCAACAATTAGATGCATCAACCTCAGTTAGATAATACTAGGTTTTTATATAACGAAG
 TTAGTAATGCG

45

Seqüências de "primers": (A seqüência realçada é a região que se alinha ao gene *OsAPx*, a outra região alinha-se ao vetor, em parêntese encontra-se a seqüência inversa complementar do "primer reverse")

50

qRT-PCR:

"Forward": CTCGAGAGGGCAATCTTGGACATCTG

"Reverse": GGTACCTCGAGGATCAAACCTTTGCCCAAGA

55

5 ***OsAPx6* (Número de Acesso NCBI: AK061107)****Seqüência cDNA completo:**

GACCACGGAGCAGCGAACCACTCCCAAAAACGCCACCAAAACCCCTCCTCTCCCCACCTCCGCC
 GCCGCCGACATGGCCGTCGTCCACCGCCTCCTCCGCCGCGGCCTCTCCGCCGCCTCTCCCCTC
 10 CCTCTCTTTCAGGAGCTCGGGAGGCGTCCGGCGAGCTCGTCCGGCGGCGGGCGGGGGACG
 CGGCGGCTGAGCTGCGGGGCGCGGGGAGGACGTCAAGCAGCTGCTCAAGTCCACCTCCTG
 CCATCCCATCCTGGTTTCGGTTAGGGTGGCATGATGCTGGTACTTATGACAAGAACATTACTG
 AATGGCCAAAGTGTGGTGGTGGCAATGGTAGCTTGAGATTGAAATTGAGTTAAACATGC
 GGCTAATGCAGGTCTTGTGAATGCTTTGAAGCTGATCCAGCCATCAAAGACAAGCATGCAG
 15 GTGTCACCTTATGCAGATCTGTTTCAGCTCGCCAGTGTACAGCCATTGAGGAAGCCGGTGGC
 CCAAGATCCCCATGATCTATGGAAGGGTTGATGTTGCTGCCCTGAACAATGCCCGCCAGA
 GGGGAGACTTCCTGCTGCTGGCCCTCCTTCACCTGCGGAACATCTACGAGAAGTATTCTATA
 GAATGGGCCTGAGTGACAAGGAAATTGTTGCATTGTGAGGAGCTCATACTTGGACGATCT
 AGACCAGAGCGCAGTGGATGGGGCAAACCAGAACTAAATACACTAAAAACGGACCTGGT
 20 GCACCTGGAGGGCAATCTTGGACATCACAGTGGCTGAAGTTTGATAATAGTACTTCAAG
 GACATCAAAGAACGCCGAGATGAGGACCTTCTAGTTCTGCCTACTGATGCTGTGCTCTTTGA
 GGACTCATCATTCAAGATCTATGCTGAAAAGTACGCCCGCAGATCAGGATGCATTTTTTGAAG
 ACTATGCTGAAGCTCATGCCAACTGAGCAATCTCGGAGCAAAGTTTGATCCTCCAAAGG
 GTATTTCACTGGAATAAGTGGCGTCTGCTGCCGATGAGCTGCATTTGGCGAATGAACAAGA
 25 CGATACCTGTTTCTTCTTGCTACTATAGAGCATATTATGGTTTTATTACCGATCCAGAAATT
 TAATCCATTGATCGGCAAATGTGATGTTGGTGTGTTTGTATTGAGTTGTGCTCTCCATTAGAAA
 TAAAAATAGCGGTGGCCATTTTCGTTTCCAGGACCAAACATTTTGGCACATTACAATACAAT
 GTTTTAGATGATGTCTGCATTGAGCTTTACACAGGATGATCAAAATATATGACATAATTTAT
 TACTG
 30

Seqüências de “primers”: (A seqüência realçada é a região que se alinha ao gene *OsAPx*, a outra região
 35 alinha-se ao vetor, em parêntese encontra-se a seqüência inversa complementar do “primer reverse”)

qRT-PCR:

“Forward”: CTCGAGAGGGCAATCTTGGACATCAC

“Reverse”: GGTACCTCGAGGATCAAACCTTTGCTCCGAGA

40

45 ***OsAPx7* (Número de Acesso NCBI: AB1148551, AK103344)****Seqüência cDNA completo:**

GCAAGGCCACGCTCCCCTCCCTCCCAACCAACCCACCACCAGCGTCACCCATGGCGGCCAGC
 GACTCGCCGCCCTCCACGCCGCCGCGCCGTCGGCCTTCTCCTCCACCTCCTCCGCCTCGCATG
 50 GCCGCCCGCGGCGCGATCCAGCACCACCGTCTCCTCCCGGTGGCCCTCCCGCGCGCCTCC
 GCCACCCTCCGCGCCGCACCTTCTCGGCTCCTCCCCAGGAGGCGAAGGCGGCGGGGAGCG
 GCAGGTCCGTGATGTGCATGGCGTCGGCGTCGGCGTCGGCGGCGTCCGGCGGCGGTGGCGTC
 GGGCGCGGCGGAGCTGAAGGCCGCTCGCGAGGACATCAGGGAGCTCCTCAAGACGACGCAC
 TGCCACCCCATCCTGGTTCGTCTTGGATGGCATGATTCCGGTACGTATGACAAGAATATTAA
 55 AGAGTGGCCACAACGAGGTGGAGCTAATGGAAGCTTGAGATTTGATGTTGAGTTAAACAT

GGAGCCAATGCTGGGCTGGTAAATGCTCTAAAGCTTGTCCAACCTATCAAGGACAAATACCC
 AAATATCTCATATGCGGATTTATTCCAGCTGGCAAGTGCTACAGCAATTGAGGAAGCTGGTG
 GTCCAAAGATTCCAATGACATATGGACGGATTGATGTCACAGGTCCTGAGCAGTGTCCACCT
 GAGGGGAAGCTTCCCGATGCTGGCCCAAGTGCACCTGCGGATCACTTGAGGAAGGTATTTTA
 5 CAGGATGGGTCTTGATGACAAGGAGATTGTTGTGCTGTCTGGAGCACATACACTTGGAAGGT
 CCAGACCTGAACGGAGTGGCTGGGGGAAACCAGAAACGAAATATACTAAGAATGGCCCTGG
 TGCACCTGGTGGGCAATCGTGGACAGCTGAATGGCTTAAGTTGATAACAGTTATTTCAAGG
 AGATAAAAGAGAAAAGAGATCAGGATCTCCTGGTCTTGCTACAGATGCTGCATTATTTGAG
 GACCCAACATTCAAGGTCTATGCAGAAAAATACGCAGAGGACCAAGAAGCATTCTTTAAAG
 10 ACTATGCCGGAGCTCATGCTAAACTGAGCAATCTGGGTGCAAAATTC AATCCTCCTGAGGG
 ATTCACGTTGGACGGTTAATGCGATGCGCATGAGCCAGATCGCTGAAGTGGCCAACCACTT
 TACAGAAAGGATCAAGAGAGAAACACTACACAATCCAATTTCTGCTCCAACGTTGTGTCAT
 CATTCCAGATGAAGCTTTTCCTGACCACGAGTCATATTGGATTTGAAAAGTGAATTCGA
 AAAAAAAAAACAGACTGGCTAGAGAGGCAAATTTGAGCCGAACCTGCGGACCAAATTCGACG
 15 AGAAACCAAAAAGAAAAACATTTTAATACTATTCTTTACTTATTATGCTTT

20 **Seqüências de “primers”:** (A seqüência realçada é a região que se alinha ao gene *OsAPx*, a outra região alinha-se ao vetor, em parêntese encontra-se a seqüência inversa complementar do “primer reverse”)

qRT-PCR:

25 “Forward”: CTCGAGGAGCAATCTGGGTGCAAAAT

“Reverse”: GGTACCTCGAGGACTCGTGGTCAGGAAAAGC

30

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

Seqüência cDNA completo:

35 AAAAATCACTCGACTCGAGCGCGCGCCATGGCGGAGCGCATCGCCGCCTCCCTCCTCCC
 GGCTGCCTCGCCCTCGCCTGCTCCGTCCCCTCCCCCCCCGCGCCCCCGCTCCGCGCGGGC
 CGCCGCCTCCTTCCATGCTGCTCCACCAGCGCCGGCGGCCTCCGCCTCCGCTCCCGCCCGTC
 TCGTTCCCGCAGAAGGCTGCGACGACGAGGAGCGGGCGCGCCGGCGGGGGCGCGGGCG
 GTGGTCCGGTGCATGGCGGGCGGGCGGTGGCGCGTCCGACGCGGCGCATGCAAGAGCG
 40 CCCGGGAGGACATCAGGGAGATCCTCAAGACCACCTACTGCCACCCCATCATGGTCCGTCTT
 GGGTGGCACGATTCTGGCACGTACGACAAGAACATCGAGGAGTGGCCGAGAGGGGCGGA
 GCCGACGGGAGCTTGAGATTTGACGCCGAATTGAGCCACGGAGCCAATGCTGGTCTGATTA
 ATGCTTTGAAGCTTATCCAACCAATCAAGGACAAATACCCGGGTATAACTTATGCTGATTTG
 TTCCAGTTGGCAAGTGCTACAGCAATTGAGGAAGCTGGTGGGCCGAAAATTTCCAATGAAAT
 45 ATGGACGAGTTGATGTCACAGCAGCTGAGCAGTGCCACCAGAGGGGAGGCTTCTGATGC
 CGGTCCACGTGTGCCCGCTGATCATCTTAGGGAGGTATTCTACAGGATGGGCCTTGATGACA
 AGGAAATTTGTTGATTATCTGGAGCACACACTTGGAAAGATCAAGACCTGACAGGAGTGG
 CTGGGGAAAGCCAGAAACAAAATATACTAAGGATGGGCCTGGTGAACCTGGAGGGCAATCA
 TGGACAGTTGAATGGTTGAAGTTTGATAACAGTTACTTCAAGGACATAAAAGAGCAAAGGG
 50 ACCAGGATCTTCTAGTGCTACCCACAGATGCTGCATTATTTGAGGATCCGTCCTTCAAGGTAT
 ATGCCGAAAATATGCAGAGGATCAGGAGGCATTCTTTAAAGACTACGCTGAAGCTCATGC
 TAAACTGAGCGACCTTGGTGCAAAGTTCGATCCACCTGAGGGATTTTCACTGGACGATGAAC
 CAGCCGTGCAAGAGAAGGATCCTGAACCAGCACCAGCGCCAGCAGCAGCACCACCACCTCC
 ACCAGTCGAGGAGAAGAAGGAAGCTGAACCAACTCCAGTACCAGTAACGGTAGGAGCAGC
 55 AGTGGCATCATCGCCAGCGGATGACAACAACGGTGCAGCACCAGCAACCAGAGCCCTTCGTC

GCTGCGAAATACTCCTACGGAAAGAAGGAGCTGTCGGACTCGATGAAGCAGAAGATCAGG
GCGGAGTACGAGGGATTTCGGAGGCAGCCCGGACAAGCCTCTGCAGTCCAATACTTCTCA
ACATCATGCTCTTGATCGGAGGGCTGGCCTTCTTGACGTCTCTGCTCGGGAGCTGAGAGCGA
5 TGGTCTGATGACCTCCTCTGACGAGTGTTTTGAGTTGTTCTGCCTGTGCTAAGATTTGCGTG
TTTCTCTTTCCATGTTTTGAGTCGTTATTCCGTAAATAAAATTGAGGTAAAAGGATGGGCATGT
GAATGGATTCCAGTACTTTCTGAACTTCTTGAGTAATTCCTCTAGAGAAATATTTGTCGGAGA
GAAATGTCACATTATCTAGTTGTCATGGCTCATGACT

10

Seqüências de “primers”: (A seqüência realçada é a região que se alinha ao gene *OsAPx*, a outra região alinha-se ao vetor, em parêntese encontra-se a seqüência inversa complementar do “primer reverse”)

qRT-PCR:

15

“Forward”: CTCGAGGCTGCGAAATACTCCTACGG

“Reverse”: GGTACCTCGAGAGGAGGTCATCAGACCATCG

20

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outros variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

**CONSTRUÇÃO GÊNICA, PROCESSO PARA MODULAR A RESPOSTA
OXIDATIVA EM ARROZ, PROCESSO PARA MODULAR A TOLERÂNCIA DE
PLANTAS AO ALUMÍNIO**

5

1. Construção gênica útil para a modulação da resposta oxidativa em arroz, caracterizada por compreender pelo menos parte de uma sequência nucleotídica do gene APX, sequência esta capaz mecanismos de modulação de expressão gênica do referido gene.

10

2. Construção gênica útil para a modulação da tolerância de plantas ao alumínio, caracterizada por compreender pelo menos parte de uma sequência nucleotídica do gene APX, sequência esta capaz mecanismos de modulação de expressão gênica do referido gene.

15

3. Processo para a modulação da resposta oxidativa em arroz, caracterizada por compreender o uso de pelo menos parte de uma sequência nucleotídica do gene APX, sequência esta capaz mecanismos de modulação de expressão gênica do referido gene.

20

4. Processo para a modulação da tolerância de plantas ao alumínio, caracterizada por compreender o uso de pelo menos parte de uma sequência nucleotídica do gene APX, sequência esta capaz mecanismos de modulação de expressão gênica do referido gene.

FIGURAS

Figura 1

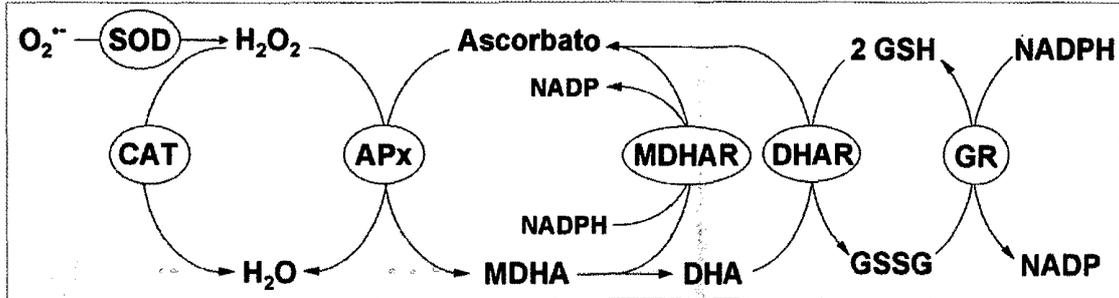


Figura 2

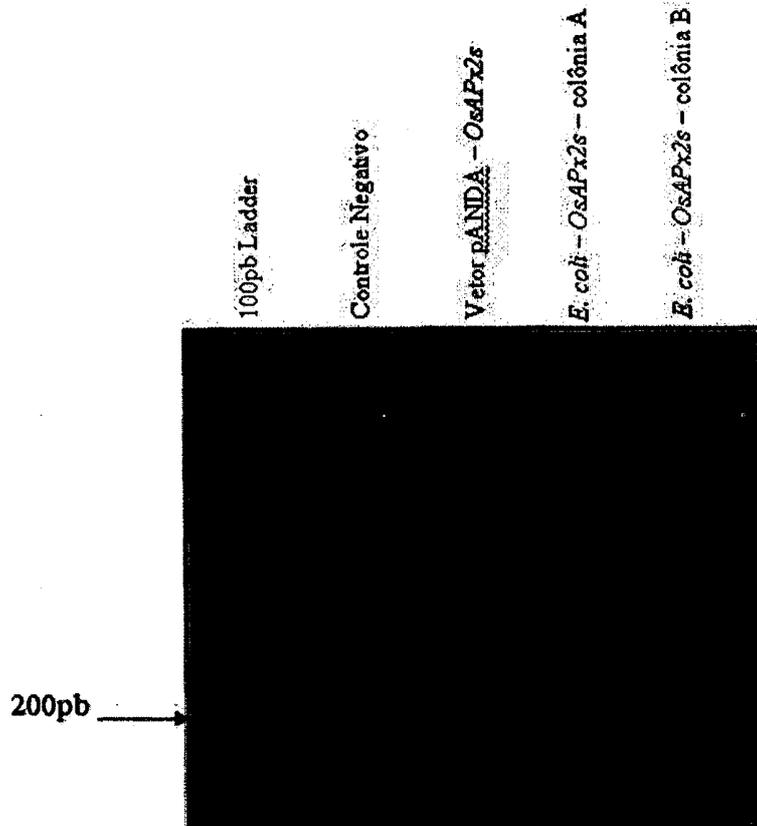


Figura 3

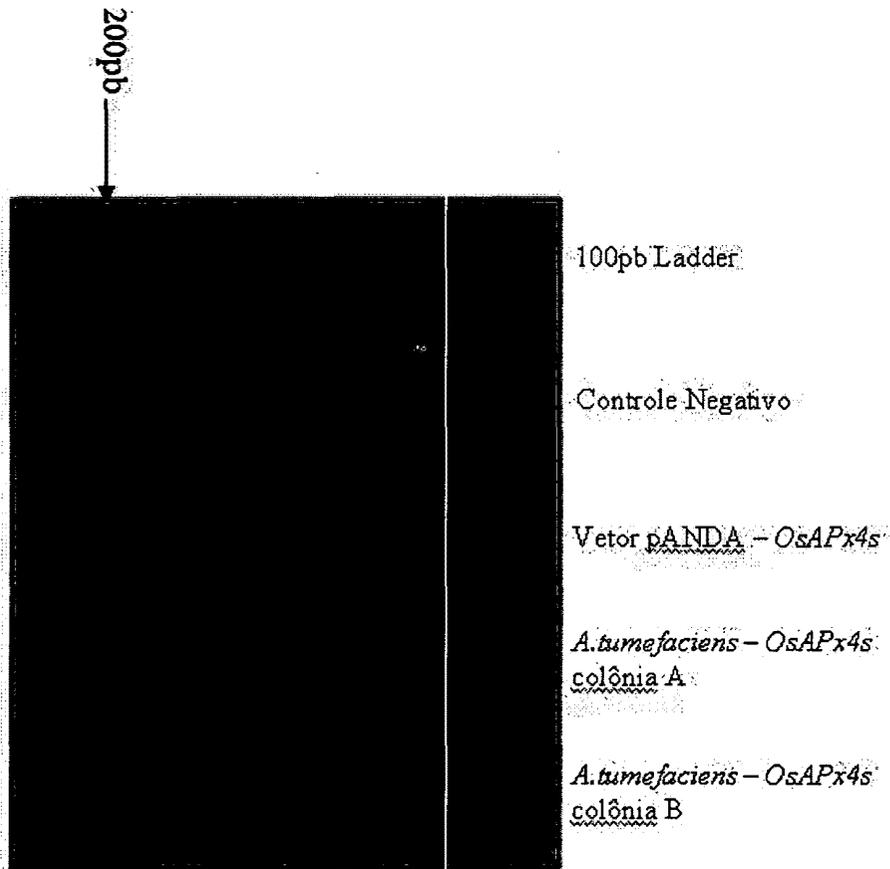


Figura 4

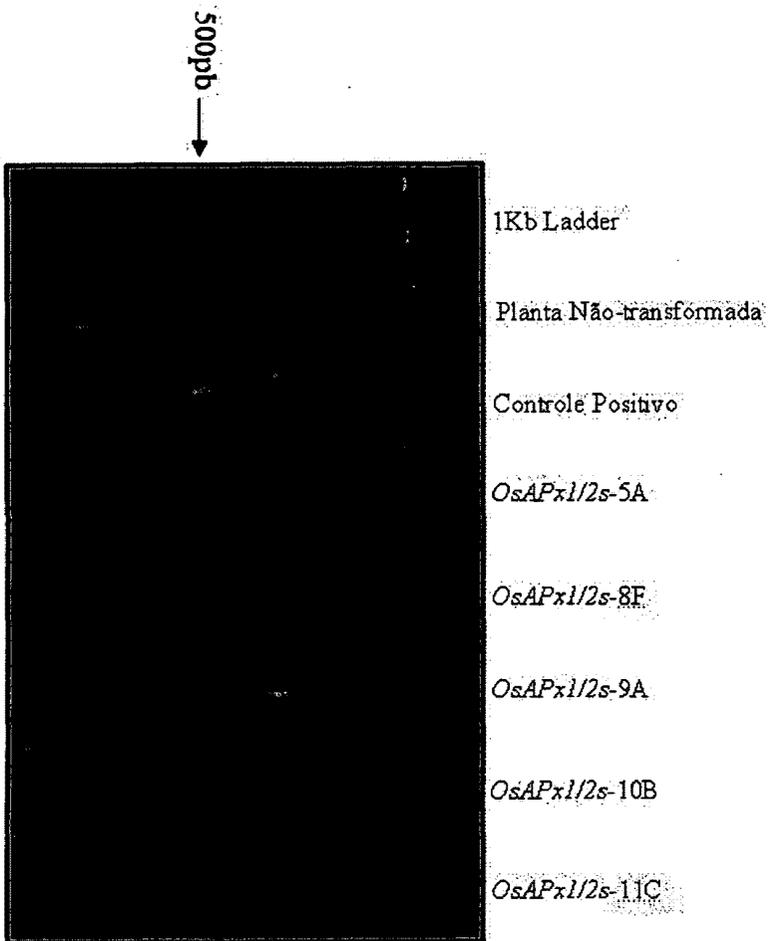


Figura 5

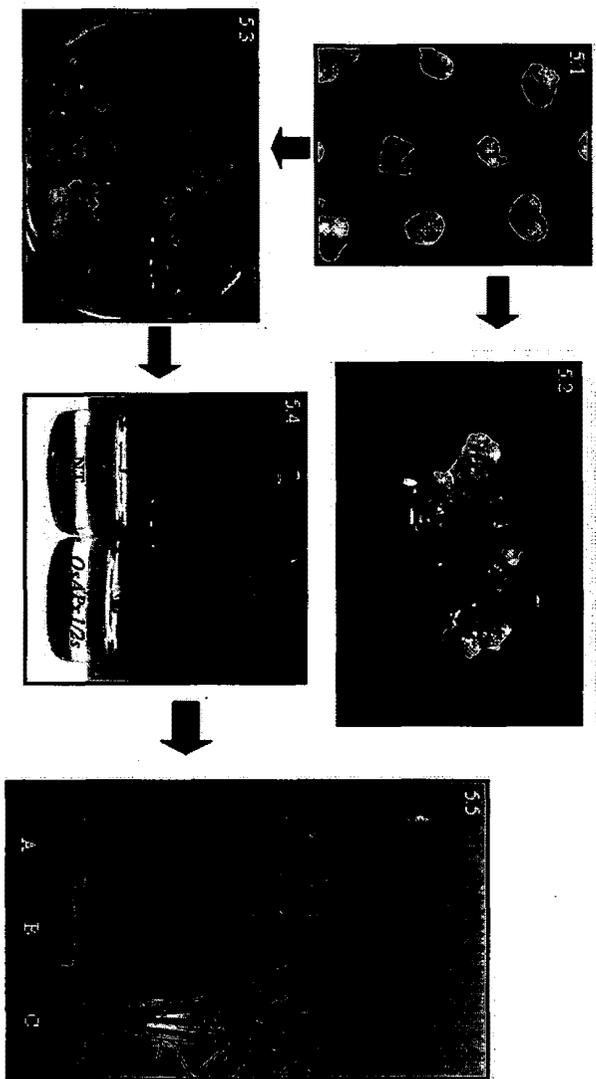


Figura 6

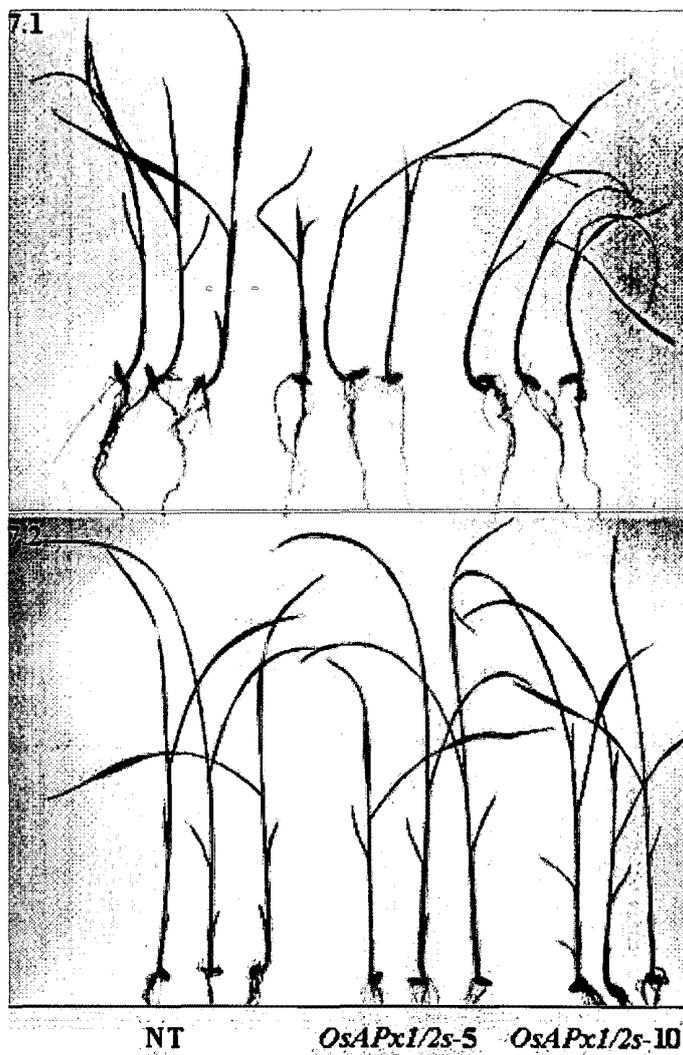


Figura 7

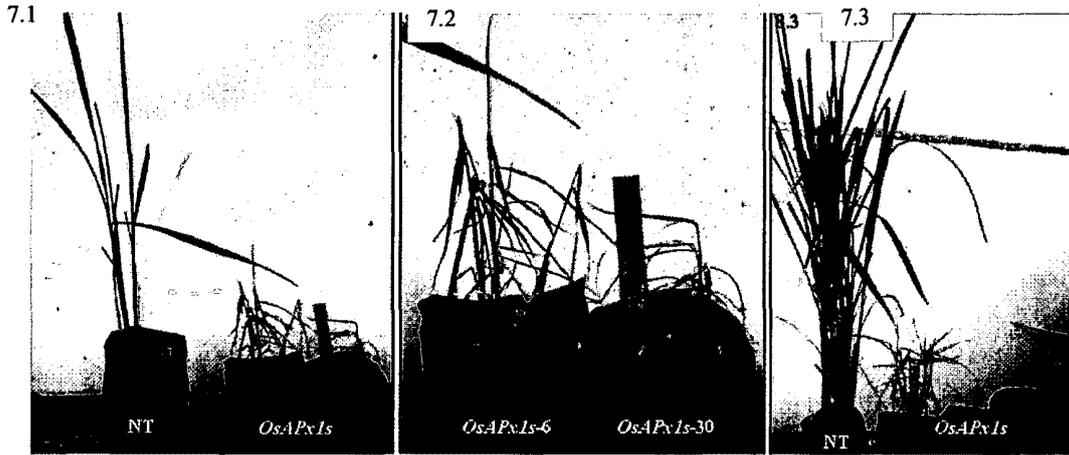
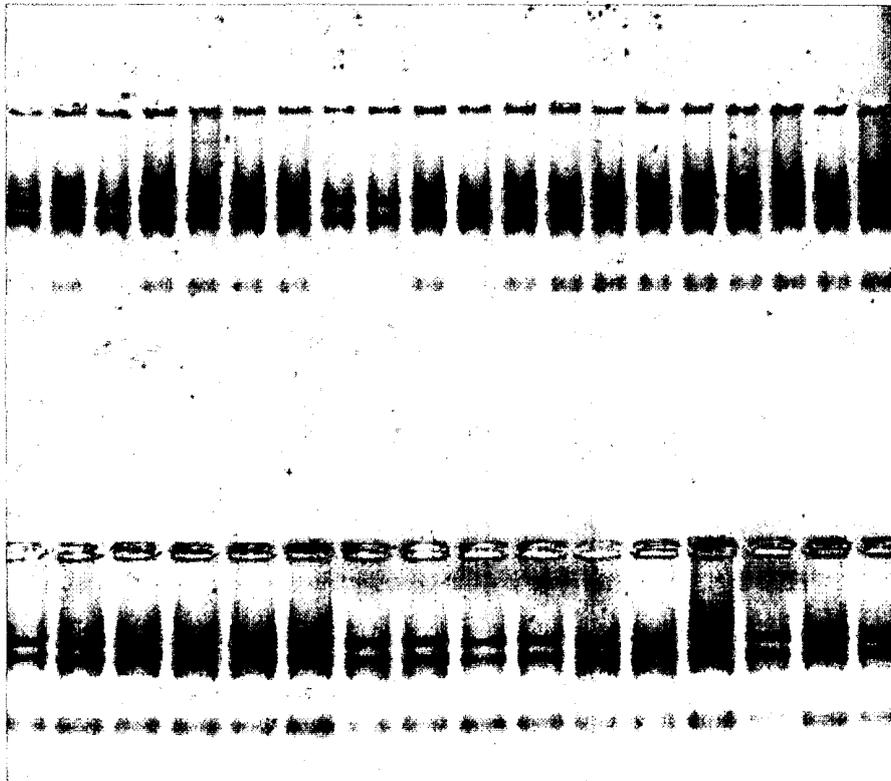


Figura 8.1



8.2

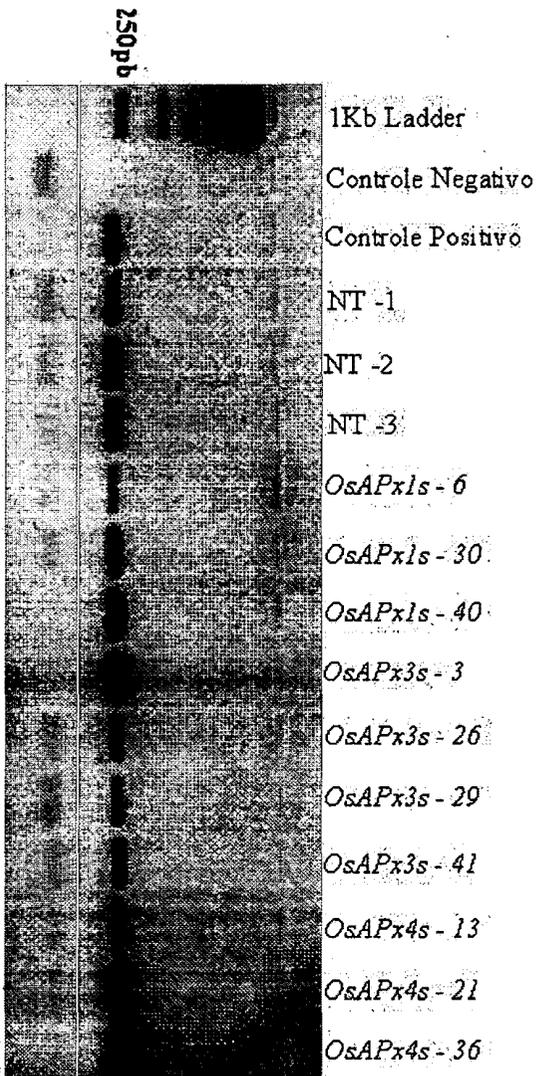


Figura 8.2

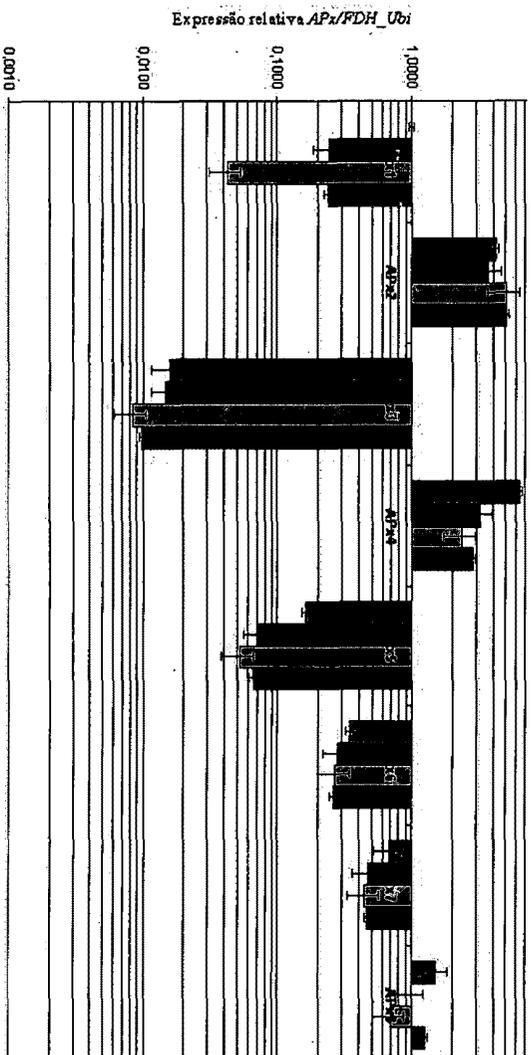


Figura 9

Figura 10



Figura 11

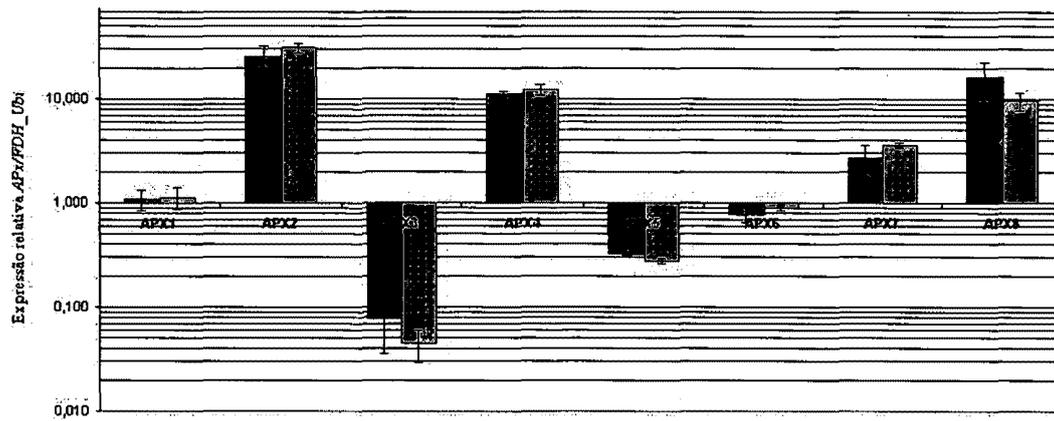


Figura 11 a

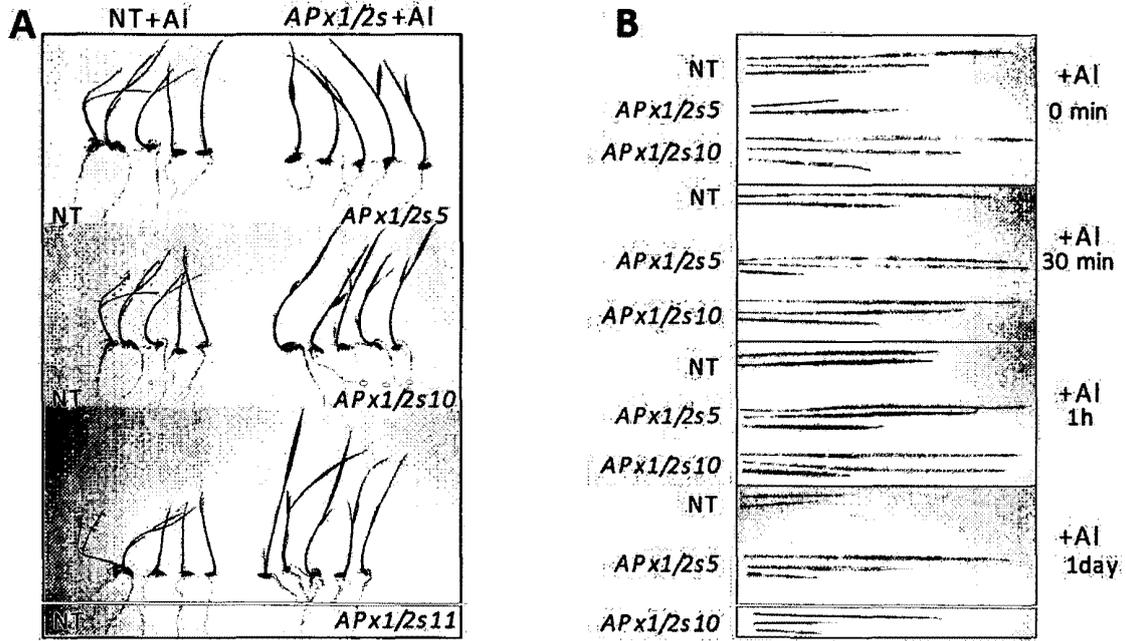


Figura 11b

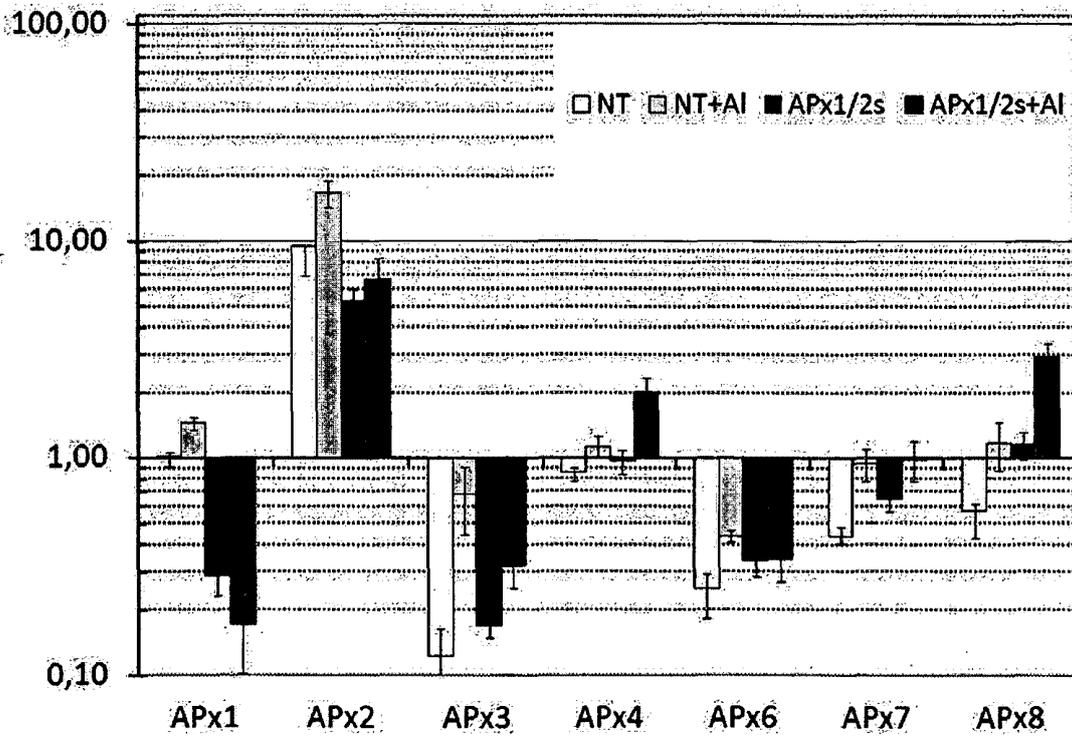


Figura 11c

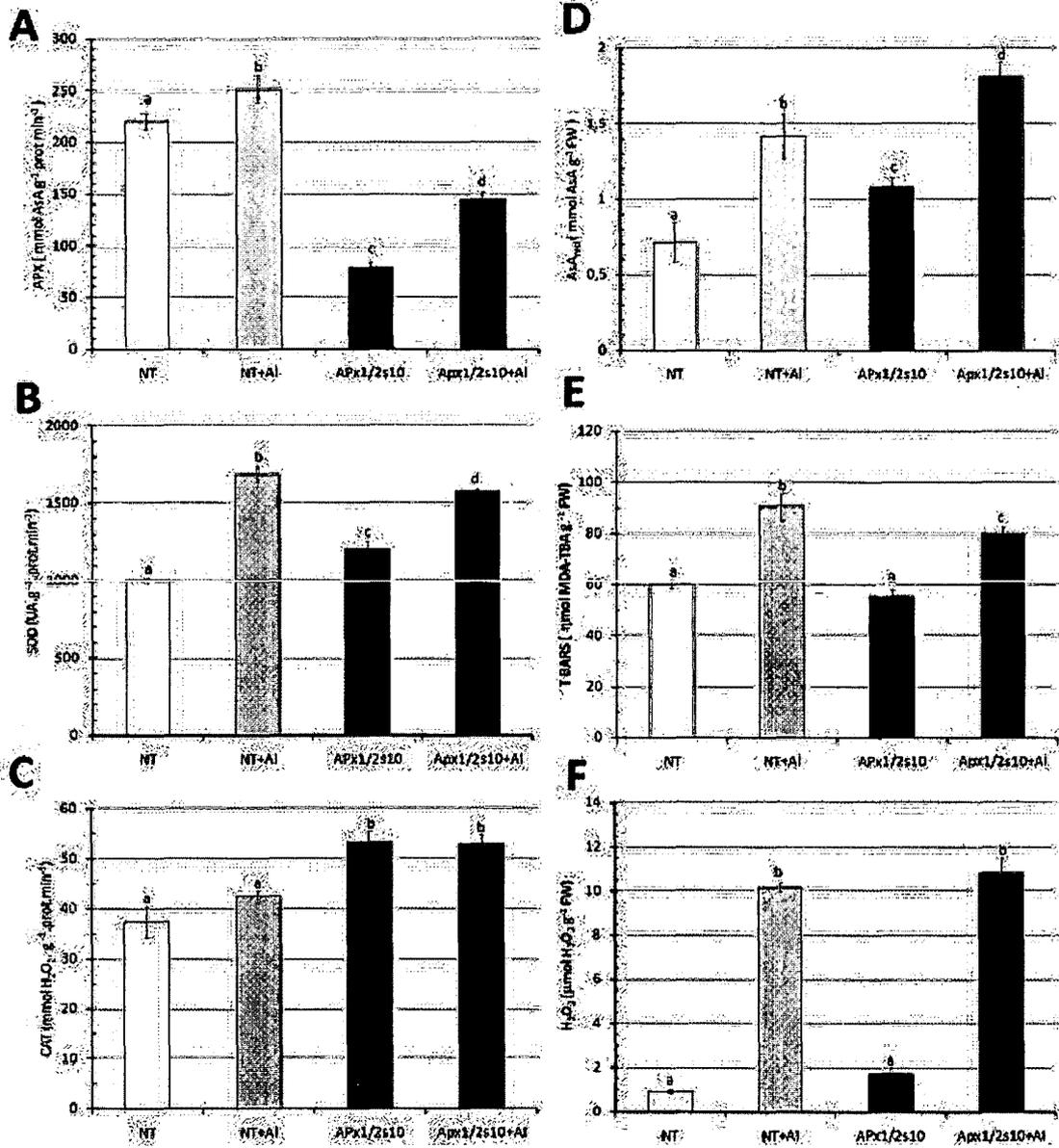


Figura 12

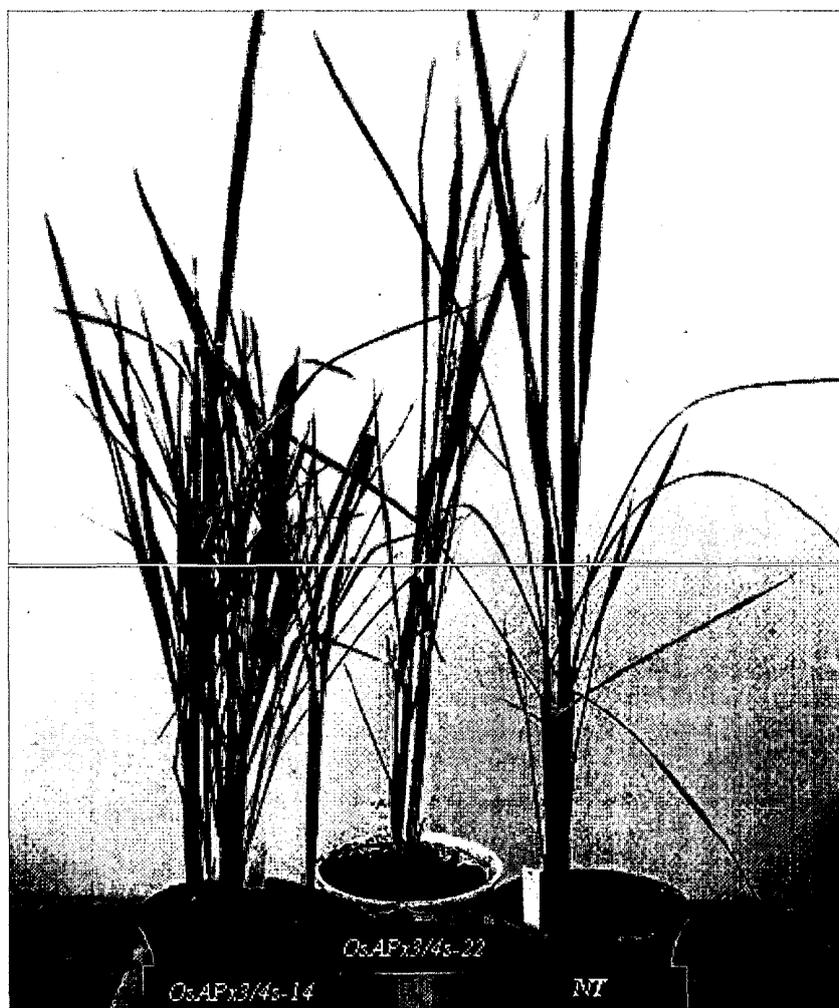


Figura 13

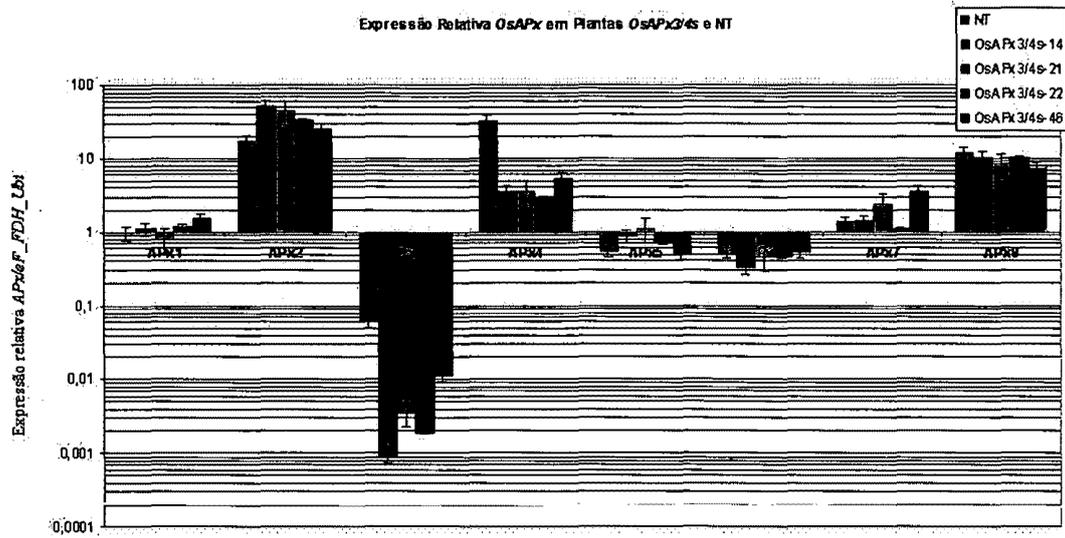


Figura 14



Figura 15

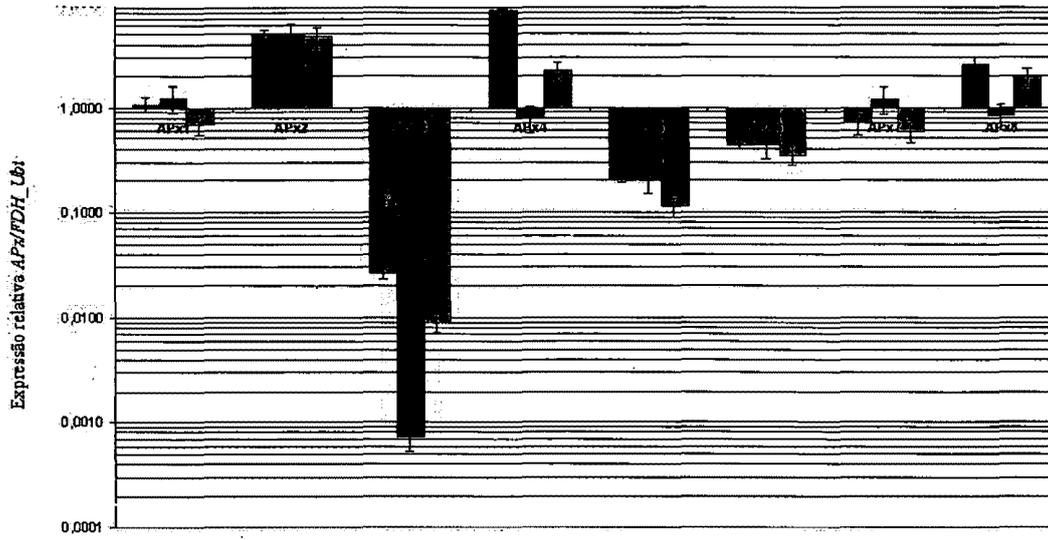
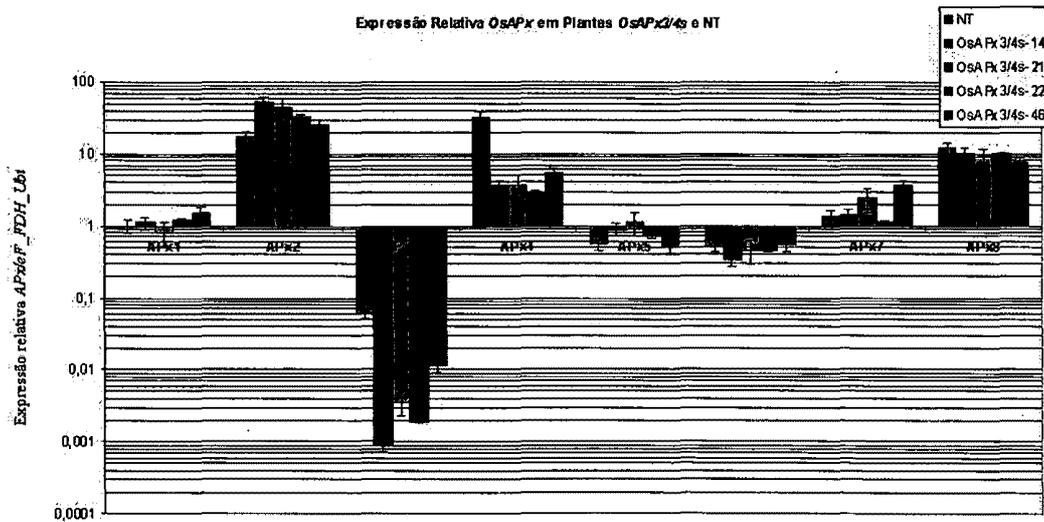


Figura 16



Figura 17



Resumo

CONSTRUÇÃO GÊNICA, PROCESSO PARA MODULAR A RESPOSTA OXIDATIVA EM ARROZ, PROCESSO PARA MODULAR A TOLERÂNCIA DE PLANTAS AO ALUMÍNIO

A presente invenção proporciona: construções gênicas; processos para modular resposta oxidativa em arroz; e processos para modular a tolerância de plantas ao alumínio. Os objetos da invenção têm como conceito inventivo comum o uso de funcional de APX citosólicas (*OsAPx1* e *OsAPx2*) e peroxissomais (*OsAPx3* e *OsAPx4*) de arroz. Em uma concretização preferencial, os processos da invenção compreendem, entre outros, o silenciamento pós-transcricional por RNA de interferência (RNAi) dos genes individualmente e de ambos os genes codificantes de isoformas do mesmo compartimento subcelular. A redução da expressão de cada gene, assim como de ambos os genes de um compartimento, de acordo com a presente invenção, resulta no desenvolvimento de diferentes sinais. As plantas RNAi apresentam diferentes fenótipos e padrões de expressão transcricional dos genes da família *OsAPx*.