

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

“ANÁLISE FUNCIONAL DAS ISOFORMAS CITOSÓLICAS E PEROXISSOMAIS
DE ASCORBATO PEROXIDASE EM ARROZ (*Oryza sativa* L)”

CAROLINA WERNER RIBEIRO

Porto Alegre

-2012-

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

“ANÁLISE FUNCIONAL DAS ISOFORMAS CITOSÓLICAS E PEROXISSOMAIS
DE ASCORBATO PEROXIDASE EM ARROZ (*Oryza sativa* L)”

CAROLINA WERNER RIBEIRO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração: Biologia Molecular.

Porto Alegre

-2012-

Orientadora

Prof. Dra. Márcia Pinheiro Margis

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Genética Vegetal do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre), em colaboração com o Prof. Dr. Márcio Alves-Ferreira do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro), com o Prof. Dr. Joaquim Albenísio da Silveira do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza) e com o Prof. Dr. Jorge Mariath do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre).

Fontes financiadoras

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS);
- United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO);
- International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB)

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| AGRADECIMENTOS..... | 6 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 8 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 10 |
| RESUMO..... | 12 |
| ABSTRACT..... | 13 |
| | |
| INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1. Estresse oxidativo..... | 14 |
| 2. Espécies Reativas de Oxigênio..... | 16 |
| 3. Peróxido de hidrogênio..... | 18 |
| 4. Mecanismos de defesa antioxidante..... | 20 |
| 5. Ascorbato peroxidase..... | 22 |
| 6. Arroz: modelo vegetal..... | 24 |
| 7. Estudo funcional do sistema antioxidante..... | 28 |
| OBJETIVOS..... | 31 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 33 |
| CAPÍTULO 1: ISOFORMAS CITOSÓLICAS DE ASCORBATO PEROXIDASE..... | 46 |
| CAPÍTULO 2: ISOFORMAS PEROXISSOMAIS DE ASCORBATO PEROXIDASE..... | 99 |
| DISCUSSÃO GERAL..... | 133 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 138 |
| APÊNDICE..... | 155 |
| CURRICULUM VITAE..... | 159 |

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Márcia Margis, pela orientação, suporte e incentivo na realização deste trabalho, pelo apoio às minhas idéias, pela oportunidade de trabalhar com diferentes técnicas e pela sinceridade nas palavras sempre buscando o melhor. Obrigada por acreditar em mim!

Ao Dr. Marcio Alves-Ferreira (UFRJ), pela ajuda na programação e execução de experimentos de microarranjo e hibridização *in situ* e análise dos dados, por todo o suporte nas viagens ao Rio de Janeiro e pela co-orientação “não-oficial”. Agradeço muito a possibilidade de ter conhecido e trabalhado com um profissional tão competente e uma pessoa maravilhosa. Muito obrigada!

Ao Dr. Rogério Margis, pela ajuda e sugestões na realização do trabalho.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para execução deste trabalho, em especial:

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (UFRGS), pela oportunidade de realização deste doutorado.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular (UFRGS), Silvia Regina Centeno e Luciano Saucedo, pelos auxílios prestados.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Elmo Cardoso, pelos auxílios prestados.

Ao Dr. Marcelo Alves Ribeiro, pelas análises estatísticas do experimento de microarranjo.

Ao Dr. Joaquim Albenisio da Silveira e Fabrício Carvalho, pela execução dos experimentos bioquímicos e de proteômica e pela ajuda na discussão dos resultados.

Ao Dr. Jorge Mariath, pela colaboração nos experimentos de análises de promotor.

Ao Dr. Adriano Silvério, pela execução dos cortes histológicos nos experimentos de análises de promotor, pela ajuda na discussão dos resultados e pelas conversas altamente explicativas sobre anatomia vegetal. Muito obrigada!

À todos os amigos do Laboratório Genética Vegetal, pela ajuda, solidariedade e amizade e aos amigos de outros laboratórios.

À todos os amigos do Laboratório de Genomas e Populações de Plantas, pela ajuda, amizade e trocas de conhecimento.

À Silvia Richter, pela amizade e auxílio durante meu doutorado.

À Silvia Rosa, pelo início dos estudos que resultaram no meu doutorado, pelos auxílios iniciais e colaboração.

Ao Julio Garighan, estagiário de iniciação científica, por toda ajuda na execução dos experimentos, pela dedicação ao trabalho e pelo companheirismo.

Aos amigos Rafael Arenhart, Lauro Bucker Neto e Ricardo Weber, pela ajuda, longas conversas e amizade.

Às amigas do coração: Gisele Passaia, Andréia Caverzan, Marta Bencke, Camila Zanella e Samanta Bolzan de Campos, pela enorme ajuda, apoio, conversas, viagens, risadas, carinho e pela amizade.

Aos amigos de longe, pelo incentivo, palavras de apoio, força e amizade.

Ao meu primo César Werner, pela amizade, suporte e companheirismo. Obrigada por me aturar e cuidar de mim esses 4 anos!

Aos meus irmãos Leandro e Daniela, pelo apoio, incentivo e compreensão, em especial à Daniela pelas conversas e discussões sobre a tese.

Aos meus pais João e Julia, por tudo que representam de bom em minha vida, por sempre estarem ao meu lado, pelo apoio, incentivo e dedicação. Muito obrigada!

À Deus, pela minha vida e por me dar forças para alcançar meus objetivos.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1: Geração de ERO por transferência de energia..... | 16 |
| Figura 2: Vias de sinalização de ERO..... | 17 |
| Figura 3: Ciclo do Ascorbato-Glutationa..... | 21 |
| Figura 4: Fases do crescimento reprodutivo do arroz..... | 25 |
| Figura 5: Estrutura da inflorescência do arroz..... | 26 |
| Figura 6: Vetor de silenciamento pANDA..... | 34 |
| Figura 7: Processo de transformação de arroz através de <i>A. tumefaciens</i> | 36 |
| Figura 8: Vetor pHGWFS7..... | 42 |
| Figura 9: Vetor pGEM T-Easy..... | 44 |
| Figura 10: Expressão do gene <i>OsAPx4</i> em plantas NT e APx4s..... | 102 |
| Figura 11: Plantas de arroz APx3s, APx4s e APx3/4s..... | 102 |
| Figura 12: Panícula de plantas NT e plantas APx4s..... | 103 |
| Figura 13: Flores de arroz de plantas NT e APx4s..... | 104 |
| Figura 14: Senescência nas plantas NT e plantas APx4s de diferentes linhagens..... | 106 |
| Figura 15: Senescência nas plantas NT e plantas APx4s de diferentes idades..... | 107 |
| Figura 16: Análises bioquímicas das plantas NT e plantas APx4s..... | 108 |
| Figura 17: Expressão dos genes <i>OsAPx3</i> e <i>OsAPx4</i> nas fase vegetativas de arroz..... | 109 |
| Figura 18: Expressão dos genes <i>OsAPx3</i> e <i>OsAPx4</i> em plantas NT de diferentes idades..... | 110 |
| Figura 19: Expressão dos genes <i>OsAPx3</i> e <i>OsAPx4</i> nas fase reprodutivas de arroz..... | 110 |
| Figura 20: Análise da expressão de <i>Gus</i> em calos de arroz..... | 111 |
| Figura 21: Plantas de arroz superexpressando a sequência promotora do gene <i>OsAPx4</i> | 112 |
| Figura 22: Cortes histológicos de plantas de arroz superexpressando a sequência promotora do gene <i>OsAPx4</i> | 113 |
| Figura 23: Teste de Acridine Orange..... | 114 |
| Figura 24: Expressão do gene <i>OsAPx3</i> nos vasos condutores do carpelo por hibridização <i>in situ</i> | 115 |
| Figura 25: Expressão do gene <i>OsAPx4</i> em tecido do esclerênquima fibroso da lema por hibridização <i>in situ</i> | 116 |
| Figura 26: Expressão do gene <i>OsAPx4</i> nos vasos condutores e parênquima do pedicelo por hibridização <i>in situ</i> | 117 |

| | |
|--|-----|
| Figura 27: Expressão do gene <i>OsAPx4</i> na região do esclerênquima fibroso da lema por hibridização <i>in situ</i> | 117 |
| Figura 28: Expressão dos genes marcadores de senescência em plantas NT e plantas APx4s..... | 119 |
| Figura 29: Análises <i>in silico</i> em bancos de dados de expressão de genes de arroz..... | 123 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA- ácido abscísico

APx – ascorbato peroxidase

APx1s – plantas de *Oryza sativa* silenciadas para o gene *APx1*

APx1/2s – plantas de *Oryza sativa* silenciadas para os genes *APx1* e *APx2*

APx2s – plantas de *Oryza sativa* silenciadas para o gene *APx2*

APx3s – plantas de *Oryza sativa* silenciadas para o gene *APx3*

APx3/4s – plantas de *Oryza sativa* silenciadas para os genes *APx3* e *APx4*

APx4s – plantas de *Oryza sativa* silenciadas para o gene *APx4*

AsA – ácido ascórbico ou ascorbato

CAM – metabolismo ácido das crassuláceas

CAT – catalase

cDNA – DNA complementar

DAB – tetrahidrocloro de diaminobenzidina

DHA- dehidroascorbato

DHAR- dehidroascorbato redutase

DNA- ácido desoxirribonucléico

eF – fator de alongamento

ERO – espécies reativas de oxigênio

FDH – formaldeído desidrogenase

GR – glutathione redutase

GPX – glutathione peroxidase

GSH – glutathione reduzida

GSSH – glutathione oxidada

Gus – β -glucuronidase

Hpt – gene de resistência à higromicina

IM - immutans

LB – meio de cultura bacteriano Luria Broth

Lip - lipase

Mb – mega bases

ME – meristema de espiguetas

MDAR- monodehidroascorbato redutase

MDHA – monodehidroascorbato

MF – meristema floral
MI – meristema de inflorescência
mRNA- RNA mensageiro
MR – meristema de ramos
MS – meio de cultura de tecidos Murashinge e Skoog
MV- metilviologênio
N6D – meio de indução de calos
NB – meio de cultura de tecidos
NBA – NB com acetoseringona
NB-HTC – NB com higromicina, timentina e cefotaxima
NBT – Cloreto de azul nitrotetrazolium
NO- óxido nítrico
NPTII – gene de resistência à canamicina (Neomicina fosfotransferase)
NT – planta não-transformada
Os12 - aminotransferase
OsAPx – ascorbato peroxidase de *Oryza sativa*
OsNAP - no apical meristem
pb – pares de bases
PCR – reação em cadeia da DNA polimerase
PrxR – peroxirredoxina
RbcaL - ribulose bisphosphate carboxylase
RNA – ácido ribonucléico
RNAi – RNA de interferência
RT – transcriptase reversa
RT-qPCR –PCR quantitativo do produto da transcriptase reversa
SIS – sonda da Hibridização *in situ*
SOD – superóxido dismutase
T-DNA – DNA transferido pela *Agrobacterium tumefaciens*
TIGR – Rice Genome Annotation Project
Ubi – ubiquitina
UV- radiação ultravioleta
WRKY – fator de transcrição *WRKY*
X-Gluc – ácido 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl b-D-glucuronico, substrato cromogênico do gene *Gus*

RESUMO

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas constantemente pelo metabolismo aeróbico. Em situações de estresse biótico ou abiótico, a produção é aumentada e a toxicidade das ERO pode conduzir a diversos danos celulares. As ERO atuam também como moléculas sinalizadoras regulando a expressão de genes de defesa a estresses, senescência, morte programada da célula, crescimento e desenvolvimento da planta, entre outros processos. 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 dessas moléculas. A ascorbato peroxidase (APx) é uma enzima fundamental do metabolismo antioxidante, catalisando a decomposição do peróxido de hidrogênio. Em arroz, a família APx é codificada por oito genes, cujas isoformas são caracterizadas por sua localização subcelular: citosólica, peroxissomal, mitocondrial ou cloroplastidial. Este trabalho teve como objetivo caracterizar funcionalmente as ascorbato peroxidases citosólicas (APx1 e APx2) e peroxissomais (APx3 e APx4) de arroz, estudando o papel destas isoformas nos mecanismos de defesa das plantas. A estratégia utilizada foi a obtenção e caracterização de plantas silenciadas para diferentes genes por RNA de interferência (RNAi). O padrão de expressão global da planta silenciada para os genes de APx citosólicas, em comparação com a planta não-transformada, foi avaliado através de análises de microarranjo e proteômica. A análise das plantas silenciadas APx1/2s revelou a existência de um mecanismo de compensação, com alteração de parâmetros fotossintéticos, ativação de outras enzimas antioxidantes e aclimação, possivelmente sinalizados pelos níveis mais elevados de peróxido de hidrogênio. As plantas silenciadas para os genes de APx peroxissomais apresentaram atraso no desenvolvimento da panícula e maior susceptibilidade à senescência. Os genes *OsAPx3* e *OsAPx4* são mais expressos em folhas. A isoforma APx4 apresentou expressão em folhas, raízes e panícula de arroz, principalmente nas regiões do sistema vascular. Estas análises mostram que as isoformas de APx de arroz possuem funções diferentes, relacionadas com o compartimento celular em que estão localizadas. As enzimas APx fazem parte do complexo sistema antioxidante vegetal e estes resultados visam contribuir para um melhor entendimento do papel de APx no metabolismo celular e na defesa da planta.

ABSTRACT

The reactive oxygen species (ROS) are produced constantly by aerobic metabolism. In abiotic and biotic stress, the production is increased and ROS toxicity can cause several cellular damages. ROS also act as signaling molecules in the regulation of defense gene expression, senescence, programmed cell death, plant growth and development and other processes. Since ROS are toxic and also participate of signaling events, plant cells require mechanisms that tightly regulate the intracellular concentration of these molecules. Ascorbate peroxidase (APx) is an antioxidant metabolism enzyme, which catalyzes the hydrogen peroxide scavenging. In rice, the APx family is formed by eight genes, which isoforms are characterized by their subcellular localization: cytosol, peroxisome, mitochondria and chloroplast. This work aimed to characterize at functional level the cytosolic (*OsAPx1* and *OsAPx2*) and the peroxisomal (*OsAPx3* and *OsAPx4*) ascorbate peroxidase encoding genes in rice, studying the role of their products in plant defense mechanisms. The general strategy used was to produce and to characterize plants silenced for different APx genes by RNA interference (RNAi). The global expression pattern of silenced plants for cytosolic APx, compared with the non-transformed plant, was analyzed by microarray and proteomics experiments. These revealed the existence of a compensatory mechanism, which include alterations in photosynthetic parameters, activation of other antioxidant enzymes and acclimation, possibly induced by higher levels of hydrogen peroxide. Plants silenced for peroxisomal APx genes showed a delay in panicle development and were more susceptible to senescence. The expression analyses revealed that *OsAPx3* and *OsAPx4* genes present higher expression in leaves. The APx4 isoform is expressed in leaves, roots and panicles of rice, mainly in the vascular system. These analyses showed that rice APx isoforms may play different functions related to the cellular compartment in which they are located. APx enzymes are part of the complex plant antioxidant system and these results may contribute to a better understanding of the APx role in the cellular metabolism and plant defense.

INTRODUÇÃO

1. Estresse oxidativo

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

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

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

A maioria dos agentes estressantes gera o que se conhece por estresse oxidativo (Gille e Sigler, 1995; Bartosz, 1997). De maneira geral, o estresse oxidativo pode ser definido como o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), gerando um descontrole do potencial de oxidação. Este desequilíbrio na relação entre compostos antioxidantes e pró-oxidantes é devido às taxas de produção de ERO superiores à taxa do metabolismo, causando danos oxidativos aos componentes metabólicos. Durante o quadro de estresse oxidativo, a taxa de reparo do dano é menor que a oxidação,

causando acúmulo de componentes de danos celulares que levam à perda de função de organelas e eventual morte (Foyer e Noctor, 2011).

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

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

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

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

Interações entre estresse salino e estresse oxidativo foram relatadas em várias espécies vegetais. Estes relatos demonstraram diversas alterações no metabolismo antioxidante quando plantas ou culturas de células foram expostas ao sal. Todos os organismos têm respostas adaptativas para o estresse oxidativo induzidos por mudanças nos níveis de ERO, levando à ativação ou silenciamento de genes que codificam enzimas de defesa, fatores de transcrição ou proteínas estruturais (Dalton et al, 1999). A maioria dos estudos que descrevem as alterações decorrentes do estresse oxidativo é baseada na dosagem da atividade de enzimas antioxidantes e dos danos oxidativos aos componentes celulares. Alguns trabalhos realizados com plantas de arroz submetidas a

estresse abiótico têm sido publicados (Lin e Kao, 2000; Lee et al., 2001; Dionísio-Sese e Tobita, 1998; Menezes-Benavante et al., 2004).

2. Espécies Reativas de Oxigênio

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

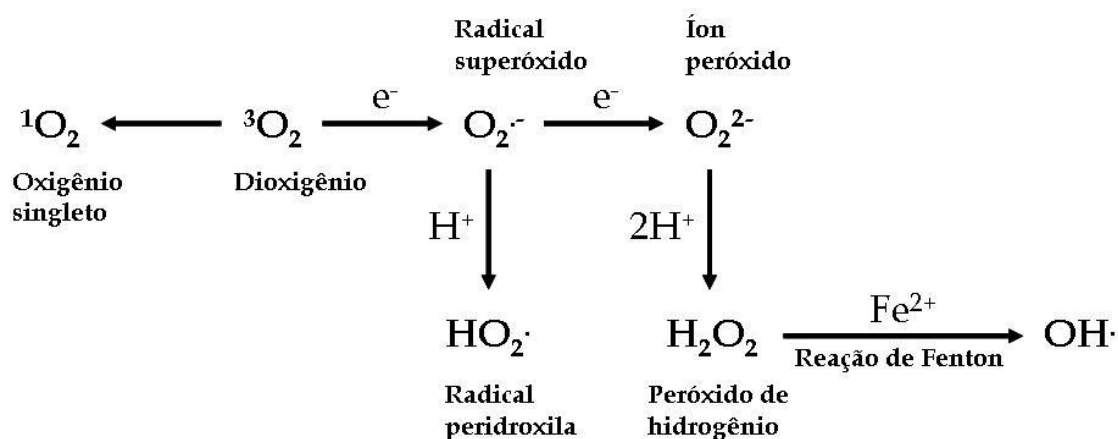


Figura 1. Geração de ERO por transferência de energia (modificado de Gill e Tuteja, 2010).

Desde a introdução do oxigênio molecular no nosso ambiente, através do aparecimento de organismos fotossintéticos, as ERO tornaram-se presença não convidada da vida aeróbica (Halliwell, 2006). Estas moléculas são produzidas continuamente em baixos níveis pelo metabolismo natural das células, entretanto, na

presença de algum estresse, ocorre um aumento na sua produção (Miller et al., 2010). As ERO estão localizadas em diferentes compartimentos celulares, como cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos, citosol, apoplasto e também são produzidas continuamente como subprodutos de várias vias metabólicas (Del Rio et al., 2006; Navrot et al., 2007; Gill e Tuteja, 2010). As principais fontes produtoras de ERO nas células vegetais são a fotossíntese, a respiração e a fotorespiração, além de NADPH oxidases, amina oxidases e peroxidases de parede celular, ativadas durante a morte celular programada e defesa contra patógenos (Mittler, 2002). A Figura 2 apresenta um esquema das vias relacionadas com o metabolismo das ERO.

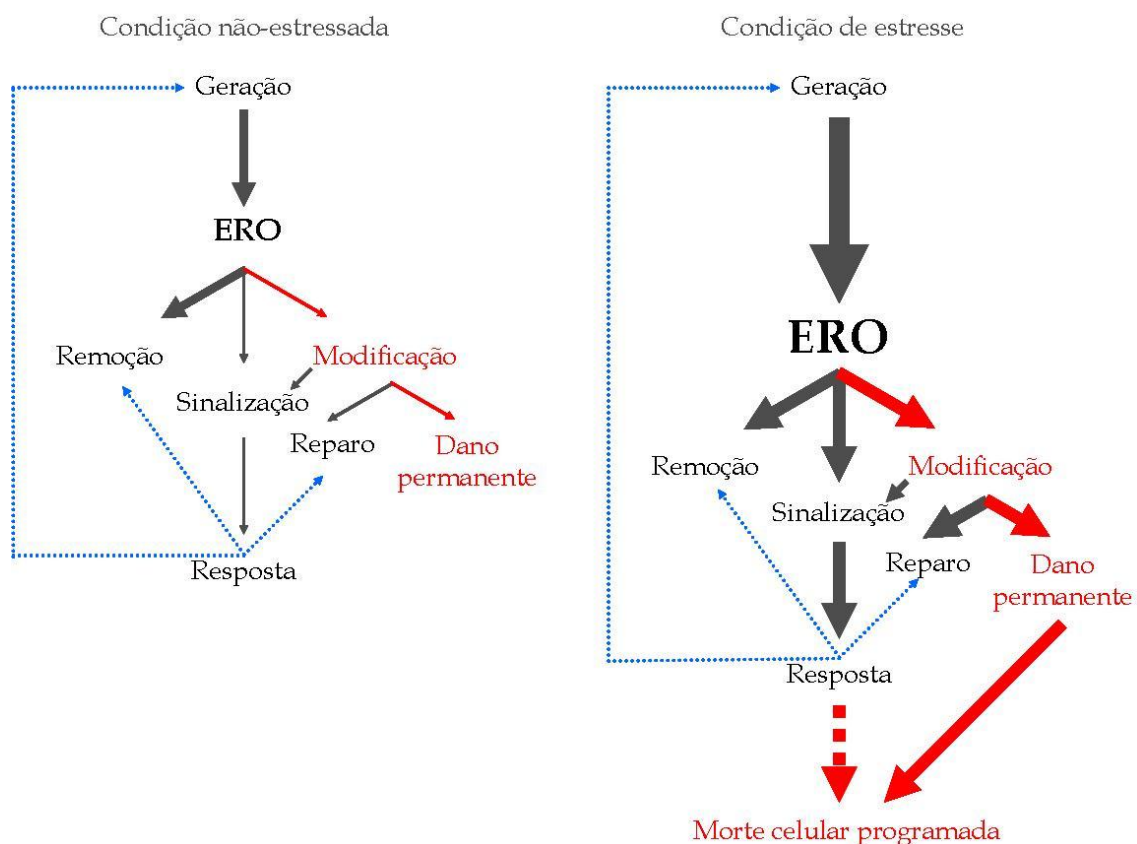


Figura 2. Relação entre produção de ERO, remoção, modificação, sinalização, e danos nas células vegetais em (a) condições não estressada e (b) condições de estresse (modificado de Moller et al., 2007).

Existem diferentes tipos de ERO produzidas na célula vegetal e cada molécula de ERO está relacionada com a ativação de vias de sinalização diferentes (Foyer e Noctor, 2011; Gadjev et al., 2006). A alta produção de ERO durante estresse salino é ocasionada pela deficiência do sistema de transporte de elétrons em cloroplastos e

mitocôndria e pela indução de vias metabólicas, como a fotorespiração (Sivakumar et al., 2000). Para tentar minimizar a superprodução de ERO, as plantas utilizam alguns mecanismos para reduzir os efeitos, como: adaptações anatômicas nas folhas alterando o movimento foliar, adaptações fisiológicas como o metabolismo das plantas C4 e CAM, mecanismos moleculares para reprogramação da fotossíntese alterando fotossistemas e induzindo oxidases alternativas (Mittler, 2002). A resposta da planta ao aumento dos níveis de ERO dependerá da concentração e sítio de produção de ERO, bem como da interação destas com outras moléculas de resposta a estresse (Moller et al., 2007).

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

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

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

3. Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio é gerado a partir da dismutação do superóxido. Essa molécula tem uma reatividade moderada, alta permeabilidade através das membranas e

maior meia-vida, de 1 ms (Gill e Tuteja, 2010). Por esses motivos é a ERO mais abundante nos sistemas biológicos aeróbicos (Wan e Liu, 2008). O peróxido de hidrogênio é constantemente produzido pelo metabolismo normal da célula, mas tem sua produção aumentada em resposta a estresses abióticos, como radiação ultravioleta, estresse salino, seca, excesso de luz, alta e baixa temperatura, induzindo resistência a estes estresses e protegendo a célula (Gill e Tuteja, 2010). Quando altos níveis acumulam na célula, o peróxido de hidrogênio pode direta ou indiretamente oxidar o *pool* de ascorbato e glutatona e alterar o estado redox da célula (Wan e Liu, 2008).

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

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

Em resumo, o peróxido de hidrogênio atua como um metabólito celular tóxico, porém também funciona como uma molécula sinalizadora envolvida em resposta a vários estímulos tanto em células vegetais como animais. Em plantas, o peróxido de hidrogênio desempenha um duplo papel, atuando como uma molécula de sinalização envolvida na aclimatação para tolerância a diversos estresses bióticos e abióticos em baixas concentrações na célula e, em altas concentrações, leva à morte celular programada (Quan et al., 2008; Neill et al., 2002). O peróxido de hidrogênio está envolvido em uma ampla gama de processos fisiológicos como um regulador chave para a senescência, fotorrespiração, fotossíntese, movimento dos estômatos, ciclo celular, crescimento e desenvolvimento da planta (Peng et al., 2005; Noctor e Foyer, 1998; Bright et al., 2006; Mittler et al., 2004; Foreman et al., 2003).

4. Mecanismos de defesa antioxidante

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

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

O sistema de defesa antioxidante das células vegetais é formado por componentes não-enzimáticos e enzimáticos. Os componentes não-enzimáticos são moléculas de baixo peso molecular, como o ascorbato, a glutatona, o tocoferol e os carotenóides (Chun et al., 2005; Soares, 2002). O ascorbato e a glutatona são moléculas essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta (Foyer e Noctor, 2011). Estes dois antioxidantes são mantidos em seus estados reduzidos dentro da célula por um grupo de enzimas capazes de usar o NAD(P)H para regenerar ascorbato e glutatona oxidados, sendo elas: monodeidroascorbato redutase (MDHAR), deidroascorbato redutase (DHAR) e glutatona redutase (GR) (Mittler et al, 2004). Também são utilizados como co-fatores pelas enzimas ascorbato peroxidase e glutatona peroxidase nas reações de redução do peróxido de hidrogênio em água (Slesak et al., 2007). Moléculas transportadoras de ascorbato e glutatona têm papel de destaque na determinação das concentrações específicas destes componentes e do potencial redox em cada compartimento subcelular (Noctor e Foyer, 1998; Pignocchi e Foyer, 2003).

Os componentes enzimáticos são enzimas reguladoras que impedem a ação tóxica das ERO à célula vegetal. São elas: superóxido dismutase (SOD), ascorbato

peroxidase (APx), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e peroxiredoxina (PrxR) (Scandalios, 2002; Mittler et al., 2004). A enzima SOD é a responsável por detoxificar o superóxido, produzindo o peróxido de hidrogênio, podendo este ser eliminado pelas demais enzimas antioxidantes. Sendo assim, o balanço entre a concentração de SOD e a concentração das enzimas detoxificadoras de peróxido de hidrogênio é crucial para manter o equilíbrio entre os níveis de superóxido e peróxido de hidrogênio na célula (Mittler et al, 2004).

Uma via antioxidante muito importante para a detoxificação de ERO é o Ciclo do Ascorbato-Glutaciona (Figura 3). Este compreende grande parte das enzimas detoxificantes e pode ser encontrado em diversos compartimentos subcelulares. O ciclo do ascorbato-glutaciona envolve a redução do peróxido de hidrogênio a água pela enzima APx, que utiliza o ascorbato (AsA) como doador de elétrons. O AsA oxidado gera o monodeidroascorbato (MDHA) e este pode ser espontaneamente reduzido à deidroascorbato (DHA). O AsA reduzido é recuperado pela ação da MDHAR, que utiliza NADPH nesta reação. O DHA também é recuperado para formar AsA reduzido através da ação da DHAR, usando a glutaciona (GSH) como doador de elétrons. A forma reduzida de GSH é regenerada pela enzima GR, também dependente de NADPH (Asada, 1999; Shigeoka et al., 2002).

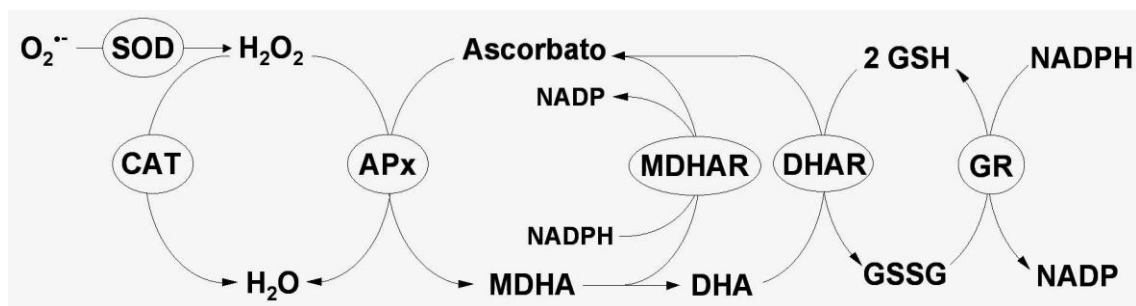


Figura 3. Ciclo do Ascorbato-Glutaciona (Teixeira et al., 2005)

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

5. Ascorbato Peroxidase

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

Diversos trabalhos já descreveram o mecanismo catalítico das APxs, assim como a estrutura 3D baseada em estudos cristalográficos e o sítio de ligação ao ascorbato (Patterson e Poulos, 1995; Mandelman et al., 1998; Wada et al., 2002; Raven, 2003; Sharp et al., 2003). Estes estudos demonstraram a existência de um núcleo catalítico comum nas APxs, contendo dois domínios típicos de heme-peroxidases. O sítio ativo possui uma histidina distal, que atua como catalisador na reação entre o peróxido de hidrogênio e a enzima, e uma histidina proximal, presente no sítio de ligação ao grupo heme (Henrissat et al., 1990).

Várias isoformas de APx têm sido descritas em diversas espécies de plantas, como algodão, arroz, *Arabidopsis*, abóbora, ervilha, soja (Teixeira et al, 2004; Koussevitzky et al., 2008; Nito et al., 2001; Mittler e Zilinskas, 1991; Shi et al., 2008; Li et al., 2007), e também em algas, euglenas e outros organismos (Gill e Tuteja, 2010). As APx podem ser encontradas em variados compartimentos celulares, incluindo citossol, peroxissomos, mitocôndrias e cloroplastos (Teixeira et al., 2004, Teixeira et al., 2006; Li et al., 2007). As isoformas de APxs são classificadas de acordo com a localização subcelular de cada enzima. No citosol e no estroma do cloroplasto são encontradas as isoformas solúveis, enquanto que as isoformas ligadas às membranas são encontradas nos peroxissomos e tilacóides do cloroplasto. A localização de cada isoforma dentro da célula é determinada pela presença de peptídios sinal organela-específicos e domínios transmembrana nas regiões N-terminal e C-terminal de cada enzima (Teixeira et al., 2004).

Estudos sobre APxs têm revelado uma modulação da expressão destas enzimas em resposta a estresses, como seca, salinidade, alta e baixa temperatura, intensidade luminosa, ataque de patógenos, tratamento com peróxido de hidrogênio e ácido abscísico (Zhang et al., 1997; Mittler et al., 1998; Yoshimura et al., 2000; Sato et al., 2001; Shigeoka et al., 2002; Agrawal et al., 2003; Fryer et al., 2003; Menezes-Benavente et al., 2004; Teixeira et al., 2006). A expressão transcricional dos genes APx

é também dependente do tecido e da fase do desenvolvimento (Agrawal et al., 2003; Teixeira et al., 2006). Na planta modelo para dicotiledôneas, *Arabidopsis thaliana*, diversos trabalhos caracterizando as isoformas de APx foram feitos. A expressão dos genes *AtAPxs* foi induzida em resposta a estresses de frio, luz UV, peróxido de hidrogênio e paraquat (Zhang et al., 1997), calor (Panchuk et al., 2002) ácido abscísico e alta intensidade luminosa (Fryer et al., 2003; Rossel et al., 2006). Plantas nocautes para os genes que codificam APx podem ou não apresentar diferenças fenotípicas. O nocaute do gene *AtAPx1* citosólico resultou em plantas com supressão no crescimento e desenvolvimento e alteração na resposta dos estômatos (Pnueli et al., 2003). Também causou o colapso do sistema cloroplastídico de decomposição de peróxido de hidrogênio, o aumento de peróxido de hidrogênio, a redução fotossintética e a oxidação de proteínas (Davletova et al., 2005). Entretanto, quando plantas de *Arabidopsis* nocautes para os genes que codificam as APxs cloroplastídicas foram obtidas, estas não apresentaram diferenças significativas em relação às plantas não-transformadas (Davletova et al., 2005; Tarantino et al., 2005). A superexpressão de APx gera plantas mais resistentes aos estresses (Rossel et al., 2006; Lu et al., 2007), como foi relatado em outras espécies submetidas a estresses, como arroz, batata, espinafre, *Festuca arundinacea*, tabaco e trigo (Teixeira et al., 2006; Tang et al., 2006; Yoshimura et al., 2000; Ishikawa et al., 2005; Zavaleta-Mancera et al., 2007).

A isoforma citosólica de APx foi identificada como uma enzima chave na regulação da morte celular programada (Foyer e Noctor, 2011; de Pinto et al., 2006). Esta isoforma pode ser ativada em resposta a diferentes tipos de estresses, apresentando função mais relacionada à proteção (Davletova et al., 2005). Cada isoforma de APx tem uma resposta diferente a estresses ambientais, indicando uma especialização funcional de cada isoforma na remoção do peróxido de hidrogênio das células (Sharma e Dubey, 2005; Teixeira et al., 2006).

Em arroz, foi identificada uma família multigênica com oito genes que codificam isoformas de ascorbato peroxidases. As APx de arroz estão localizadas em quatro diferentes compartimentos subcelulares, sendo 2 isoformas citosólicas (APx1 e APx2), 2 isoformas peroxissomais (APx3 e APx4), 1 isoforma mitocondrial (APx6), 2 isoformas cloroplásticas (APx7 e APx8) e 1 isoforma encontrada na mitocôndria e no cloroplasto (APx5) (Teixeira et al., 2004; Teixeira et al., 2006, Caverzan, dados não publicados). Plantas transgênicas de arroz silenciadas nos diferentes genes de APx foram produzidas e análises fenotípicas e fisiológicas destas plantas, frente a diversas

formas de estresses, foram realizadas. As isoformas citosólicas de APx de arroz foram silenciadas individualmente e também combinadas, resultando em plantas com diferentes características. Quando somente uma isoforma citosólica foi silenciada (plantas APx1s e APx2s), as plantas apresentaram nanismo e esterilidade. Porém, quando as duas isoformas foram silenciadas ao mesmo tempo (plantas APx1/2s), as plantas mostraram-se semelhantes às plantas não-transformadas. A falta da enzima APx acarretou em um aumento de peróxido de hidrogênio nas células e modulou a atividade de outras enzimas antioxidantes, como CAT e SOD (Rosa et al., 2010). As plantas APx1/2s foram submetidas a estresses por sal, calor, alta luminosidade e metilviologênio, tendo sido verificada uma alteração na expressão e atividade de enzimas antioxidantes, bem como nos parâmetros fotossintéticos (Bonifacio et al., 2011).

A expressão e regulação das diferentes isoformas de APx são processos controlados que atuam em conjunto com as outras enzimas detoxificadoras de ERO, buscando tornar mais eficiente o sistema antioxidante da célula vegetal.

6. Arroz: modelo vegetal

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

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

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

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

Figura 4. Estágios do crescimento reprodutivo do arroz baseados em marcadores morfológicos (modificado de Counce et al., 2000).

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

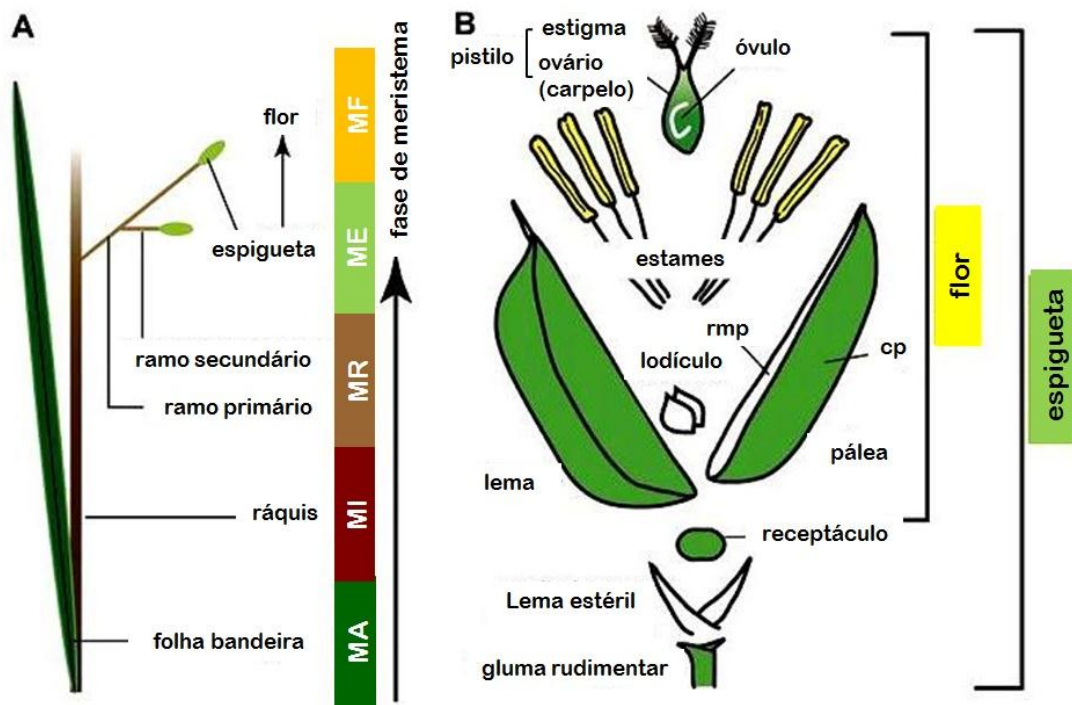


Figura 5. Representações esquemáticas da estrutura da inflorescência do arroz (A) e espigueta (B). *MA*, meristema apical; *MI*, meristema de inflorescência; *MR*, meristema de ramos; *ME*, meristema de espigueta; *MF*, meristema floral; *rmp*, região marginal da pálea; *cp*, corpo da pálea (modificado de Yoshida e Nagato, 2011)

O arroz é a terceira maior cultura cerealífera do mundo, ultrapassado apenas pelo milho e trigo e alimenta mais da metade da população humana mundial. É cultivado e consumido em todos os continentes, e destaca-se pela sua produção e área de cultivo, desempenhando papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social. Cerca de 150 milhões de hectares de arroz são cultivados anualmente no mundo, produzindo 590 milhões de toneladas, sendo que mais de 75% desta produção é oriunda do sistema de cultivo irrigado. É um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico e desempenha papel majoritário como cultura básica ou de subsistência. Nesse sentido, é considerado o cultivo alimentar de maior importância em muitos países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e Oceania, onde vive 70% da população dos países em desenvolvimento e cerca de dois terços da população subnutrida mundial. É alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas e, segundo estimativas, até 2050, haverá demanda para atender ao dobro desta população (Embrapa, 2005).

Assim como na Ásia, o arroz é um produto importante na economia de muitos países latino-americanos, ocupando o segundo lugar em produção e o terceiro em consumo pois, além de ser item básico na dieta da população, como nos casos do Brasil, Colômbia e Peru, também é um produto importante no comércio internacional (Embrapa, 2005).

O Brasil se destaca como o maior produtor de arroz fora do continente Asiático. Em 2009, a produção brasileira representou 2% do total mundial, e cerca de 50% da América Latina. O Brasil também está situado entre os países que mais produzem, consomem e importam arroz. O consumo nacional *per capita* é de 75 kg/habitante/ano, enquanto a média mundial é de 64 kg/habitante/ano. Isto significa um consumo total superior a 11,5 milhões de toneladas anuais (Embrapa, 2005).

A produção mundial de arroz não vem acompanhando o crescimento do consumo. Nos últimos seis anos, a produção mundial aumentou cerca de 1,09% ao ano, enquanto a população cresceu 1,32% e o consumo 1,27%, havendo grande preocupação em relação à estabilização da produção mundial (Embrapa, 2005).

Além de sua enorme importância econômica, o arroz também se destaca no campo das pesquisas de genética e genômica funcional. É considerada a planta modelo para estudos em monocotiledôneas, pois possui o menor genoma entre as monocotiledôneas cultivadas, de aproximadamente 390 mega bases (MB). Em 2002, foi publicado o seqüenciamento completo do genoma do arroz (Yu et al., 2002; Goff et al., 2002), o que gerou uma grande quantidade de informações genômicas disponíveis para

a comunidade científica e permitiu avanços nos estudos de genômica, transcriptoma, proteômica, metabolômica e melhoramento de cereias.

De acordo com o “Rice Genome Annotation Project 7” (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>), cerca de 49 mil genes foram identificados e depositados nos bancos de dados de arroz. Atualmente, têm-se uma grande quantidade de dados sobre transcritos de arroz, em relação a diferentes fases do desenvolvimento, tecidos da planta, respostas a estresses bióticos e abióticos, vias de co-expressão, entre outras. A identificação e caracterização de transcritos possibilitaram a descoberta de novos genes, alguns de importância agrônômica.

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

7. Estudo funcional do sistema antioxidante

A identificação e caracterização de genes que codificam enzimas pertencentes ao metabolismo antioxidante são muito importantes para entender o funcionamento deste sistema na detoxificação de ERO derivadas do metabolismo normal da célula ou geradas em resposta a estresses ambientais. Recentemente, dados de superexpressão de enzimas do metabolismo antioxidante confirmaram o papel dessas enzimas na tolerância a diferentes formas de estresse. Pesquisas utilizando plantas transgênicas tolerantes ao sal indicam estratégias para a detoxificação de células. Há estudos que mostram que plantas transgênicas superexpressando enzimas envolvidas na proteção oxidativa, como superóxido dismutases e ascorbato peroxidases, têm uma maior resistência quando crescidas em condições de estresse (Zhu, 2001).

Em estudo realizado com *Arabidopsis*, foi demonstrado que um mutante adaptado à salinidade possuía níveis basais mais elevados da atividade enzimática de APx e SOD (Tsugane et al., 1999). Além disso, em uma variedade de *Pisum sativum* mais tolerante a este estresse, foi também observado um aumento significativo nas atividades enzimáticas de Cu/ZnSOD e APx. A superexpressão de uma APx em tabaco (*N. tabacum*) aumentou a proteção das plantas ao estresse oxidativo (Allen et al., 1997). A superexpressão de uma SOD e APx em plantas de batata transgênicas aumentou a

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

Assim, é de grande relevância a identificação de genes e proteínas que formam o sistema antioxidante para o melhoramento de plantas cultivadas utilizando a engenharia genética para a construção de plantas mais resistentes a diversos tipos de estresses. Em adição à análise da expressão de genes de defesa antioxidante, é também interessante o estudo da expressão de vários outros genes envolvidos em diferentes vias de sinalização reguladas por ERO, que podem conferir às plantas tolerância a diferentes situações (Scandalios, 2002).

Hoje, com o rápido avanço das tecnologias para estudos de biologia molecular, como sequenciamento de genomas e análises de perfil de expressão gênica, é possível o estudo dos padrões de expressão gênica global em resposta a diferentes condições de crescimento e ambientais as quais os organismos são submetidos.

Sendo assim, o estudo de enzimas do metabolismo antioxidante é de extremo interesse. Nosso grupo desenvolveu uma linha de pesquisa que explora o genoma do arroz, visando uma análise evolutiva e funcional dos genes que codificam enzimas do metabolismo antioxidante em plantas, especialmente a ascorbato peroxidase. Foram identificados oito genes que codificam diferentes isoformas de APx em arroz e foi realizada uma caracterização prévia da família (Teixeira et al., 2004; Teixeira et al., 2006). Posteriormente, foram geradas plantas de arroz silenciadas para as isoformas citosólicas de APx (*OsAPx1* e *OsAPx2*) e constatou-se que o silenciamento combinado as duas isoformas citosólicas produziu plantas com fenótipo semelhante à planta não-transformada. Entretanto, o silenciamento de uma única isoforma citosólica produziu plantas anãs e estéreis. Análises bioquímicas revelaram um maior acúmulo de peróxido de hidrogênio nas plantas transformadas e a modulação de outras enzimas do sistema antioxidante, como CAT e SOD (Rosa et al., 2010). As plantas APx1/2s também apresentaram uma maior resistência quando submetidas à estresse de baixas concentrações de alumínio (Rosa et al., 2010).

A partir destes dados, as plantas APx1/2s despertaram o interesse para identificar genes que poderiam estar envolvidos na regulação do sistema antioxidante e quais vias metabólicas foram moduladas para compensar a falta de APxs no citosol. De

maneira geral, a utilização de ferramentas de biologia molecular e engenharia genética possibilita o estudo funcional de genes de defesa, gerando dados que, no futuro, permitirão utilizar estes genes para o melhoramento de plantas cultivadas de interesse agrônomo.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a caracterização e a análise funcional dos genes que codificam as isoformas citosólicas e peroxissomais da enzima ascorbato peroxidase em arroz (*Oryza sativa* L.). Estas enzimas estão envolvidas no metabolismo antioxidante e são responsáveis pela detoxificação das células, eliminando as espécies reativas de oxigênio.

O estudo objetivou utilizar técnicas de análise de expressão global para determinar e avaliar as alterações causadas em plantas que tiveram os genes que codificam as isoformas citosólicas de ascorbato peroxidase (*OsAPx1* e *OsAPx2*) silenciados. Além disso, este trabalho teve o objetivo de caracterizar funcionalmente plantas de arroz silenciadas para as isoformas peroxissomais de ascorbato peroxidase (*OsAPx3* e *OsAPx4*).

Os objetivos específicos foram:

- Obter plantas de arroz silenciadas para as isoformas APx1, APx2, APx3 e APx4, e o silenciamento combinado das isoformas APx1/APx2 e APx3/APx4;
- Analisar as alterações de expressão global do genoma de arroz em resposta ao silenciamento combinado das isoformas APx1/APx2, através de análises de microarranjo e proteômica;
- Validar os resultados obtidos nas análises de microarranjo através de experimentos de PCR em tempo real;
- Identificar as vias metabólicas alteradas pelo silenciamento combinado das isoformas APx1/APx2;
- Analisar os efeitos do silenciamento das isoformas *OsAPx3* e *OsAPx4* em plantas de arroz transgênicas;
- Analisar as plantas transformadas quanto aos efeitos fenotípicos, analisar molecularmente através de PCR e RT-qPCR e analisar as alterações bioquímicas;
- Analisar o perfil de expressão dos genes *OsAPx3* e *OsAPx4* através de técnicas de estudo de promotores;

- Analisar o padrão de expressão dos genes *OsAPx3* e *OsAPx4* nas fases de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo do arroz;
- Analisar genes marcadores de senescência nas plantas silenciadas APx4s;
- Analisar o padrão de expressão dos genes *OsAPx3* e *OsAPx4* em tecidos da panícula de arroz através de hibridização *in situ*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Construção dos vetores para silenciamento dos genes que codificam a ascorbato peroxidase

O foco deste trabalho foi o estudo de quatro genes que codificam isoformas da enzima ascorbato peroxidase de arroz, sendo elas: isoformas citosólicas *OsAPx1* (TIGR: LOC_Os03g17690) e *OsAPx2* (TIGR: LOC_Os07g49400); e isoformas peroxissomais *OsAPx3* (TIGR: LOC_Os04g14680) e *OsAPx4* (TIGR: LOC_Os08g43560).

Para o silenciamento dos genes que codificam as isoformas citosólicas e peroxissomais de ascorbato peroxidase foram construídos seis vetores no total, sendo quatro vetores para o silenciamento específico de cada isoforma (APx1, APx2, APx3 e APx4) e dois para o silenciamento combinado das isoformas localizadas no mesmo compartimento subcelular (APx1/APx2 e APx3/APx4).

Através de análises *in silico*, foram isoladas regiões específicas de aproximadamente 250 pb para o silenciamento individual de cada gene. E para o silenciamento combinado de duas isoformas foram selecionadas regiões conservadas entre os genes *OsAPx1* e *OsAPx2* e entre os genes *OsAPx3* e *OsAPx4* (Rosa, 2008).

Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos foram projetados para cada construção e utilizados para a amplificação de cada fragmento. O produto amplificado foi clonado no vetor de entrada pENTR (Invitrogen®) e posteriormente recombinado no vetor de silenciamento pANDA (Miki e Shimamoto, 2004) (Figura 6), utilizando a tecnologia GATEWAY. O vetor pANDA possibilita a clonagem do produto amplificado em duas direções opostas tendo um íntron separando as duas seqüências, o que permite, após a transcrição, a formação de um grampo de RNA, que será direcionado à maquinaria de silenciamento da célula. Além disso, o vetor pANDA possui o promotor da Ubiquitina de milho (*Ubi*), terminador *Nos* e os genes de seleção que conferem resistência à higromicina (*Hpt*) e canamicina (*NptII*). O trabalho de obtenção e recombinação das construções RNAi foi desenvolvido pelo pesquisador Dr. Felipe Teixeira.

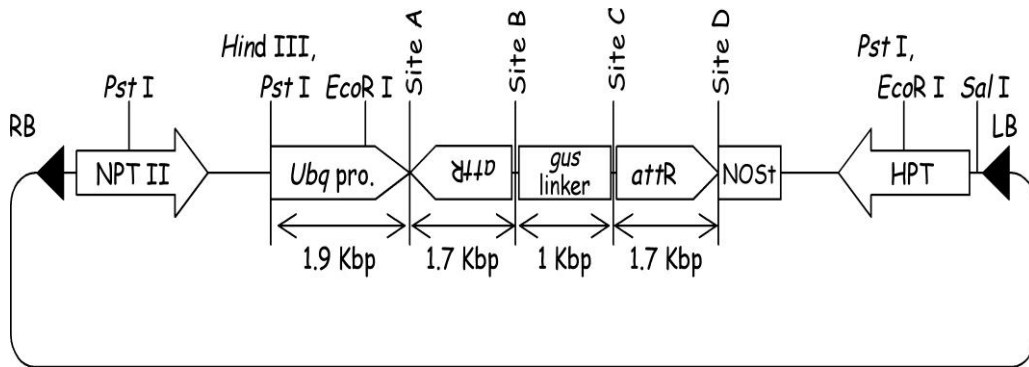


Figura 6. Vetor de silenciamento pANDA (Miki e Shimamoto, 2004).

2. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Os vetores de silenciamento foram transformados em *Agrobacterium tumefaciens* para posterior transformação de plantas de arroz. Foram utilizadas aproximadamente 100 ng do vetor para transformar células de *A. tumefaciens* AGL1, eletrocompetentes (Sambrook et al., 1989). Para transformação, foi emitido um pulso elétrico de 2500 volts para permitir a inserção do vetor na bactéria, utilizando o eletroporador ECM 399 (BTX). As bactérias transformadas foram semeadas em LB Ágar (Invitrogen®) contendo canamicina (25 µg/ml) e rifampicina (100 µg/ml) e cultivadas por um período de 48 h a 28 °C. As colônias transformantes foram analisadas por PCR, com os *primers* utilizados na amplificação dos insertos e com os *primers* para amplificação do gene *Hpt*, onde as colônias com amplificação positiva foram selecionadas para transformação de calos de arroz.

3. Obtenção de calos de arroz

A cultivar de arroz *japonica*, variedade Nipponbare, foi utilizada na transformação. Esta variedade foi escolhida pela sua estabilidade em diferentes ambientes e por possuir um protocolo de transformação genética bem estabelecido.

Foram utilizados calos embriogênicos de arroz como tecido alvo para a transformação, pois além de possuírem facilidade para regeneração de plantas, são de prático manuseio no processo de seleção em meio de cultura e permitem uma alta produção de material para o uso em transformação em pouco tempo.

Os calos foram induzidos a partir de sementes de arroz selvagens. As sementes tiveram suas cascas retiradas e foram esterilizadas por 1 min em etanol 70 %, 30 min em hipoclorito de sódio (2,5 %) sob agitação e posteriores lavagens com água destilada estéril. As sementes foram plaqueadas em meio de indução N6D (apêndice C) e mantidos a 28 °C por 30 dias em fotoperíodo de 16 horas. Para transformação com os vetores, foram selecionados os calos com potencial embriogênico.

4. Transformação de calos embriogênicos de arroz por *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação de calos de arroz foi mediada por *Agrobacterium tumefaciens* seguindo o protocolo de Upadhyaya et al. (2000). Os meios de cultura utilizados estão detalhados no apêndice C.

Calos embriogênicos de arroz foram selecionados e repicados em meio de cultura NB para proliferação. Células de *A. tumefaciens* contendo o vetor de silenciamento foram cultivadas em meio LB Agar (Invitrogen®) contendo canamicina (25 µg/ml) e rifampicina (100 µg/ml) e cultivadas por um período de dois dias a 28 °C.

As agrobactérias cultivadas foram transferidas para meio NB líquido suplementado com 100 µM de acetoseringona e, posteriormente, os calos foram adicionados a este meio, sendo incubados durante 30 min a temperatura ambiente. Os calos foram transferidos para placas contendo meio NBA (suplementado com 100 µM acetoseringona) e mantidos por três dias a 28 °C no escuro. Após o co-cultivo, os calos passaram por cinco lavagens de 13 min com água destilada estéril contendo timentina (150 µM), sendo posteriormente transferidos para meio de seleção HTC contendo higromicina (50 µg/ml), timentina (100 µg/ml) e cefotaxima (200 µg/ml) (para seleção dos calos transformados e eliminação das bactérias restantes) e mantidos no escuro por 30 dias a 28 °C. Os calos não-transformados não cresceram no meio de seleção e foram eliminados. Os calos transformados cresceram neste meio e foram repicados para novo meio HTC para proliferação.

Após a fase de seleção os calos foram transferidos para o meio de pré-regeneração por 10 dias a 28 °C no escuro e depois transferidos para o meio de regeneração, onde foram mantidos a 28 °C com fotoperíodo de 16 h até a regeneração de parte aérea e raiz. Plântulas regeneradas foram transferidas para meio ½MS (Murashige e Skoog, 1962) com metade da concentração de sais, acrescido de

higromicina (50 µg/ml). As plantas transformadas foram transferidas para substrato vermiculita, inicialmente protegidas por saco plástico para aclimação, sendo este removido aos poucos em duas semanas. Após a aclimação as plantas foram transferidas para vasos com terra, submergidas em água, e colocadas em casa de vegetação a 28 °C com fotoperíodo de 12 h. O processo de transformação genética de plantas de arroz é mostrado na Figura 7.

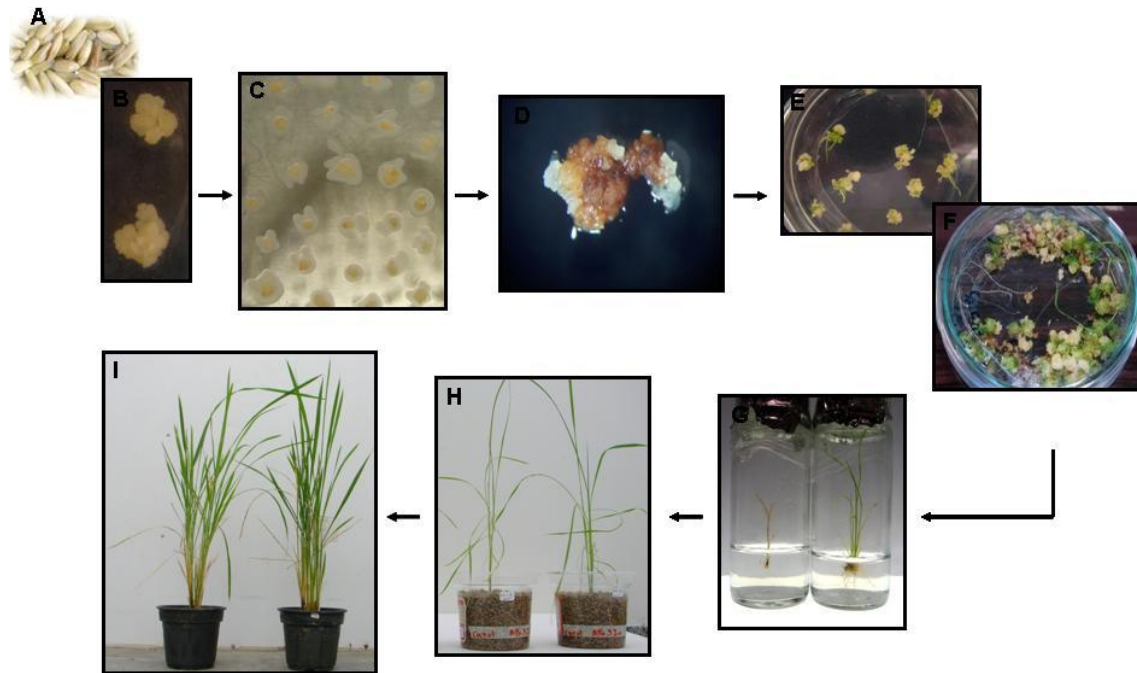


Figura 7. Processo de transformação de arroz através de *Agrobacterium tumefaciens*. (A) Sementes de arroz selvagem; (B) Calos de arroz não-transformados induzidos a partir de sementes; (C) Calos de arroz em co-cultivo com *A. tumefaciens*, contendo o vetor para transformação; (D) Calo de arroz transformado após passar por meio de seleção. Calos não-transformados oxidados (cor escura) e calos transformados em proliferação (calos brancos); (E e F) Calos de arroz transformados em meio de regeneração; (G) Plântulas de arroz em meio $\frac{1}{2}$ MS com higromicina. Plantas transformadas em crescimento e plantas não-transformadas sendo eliminadas; (H) Plantas regeneradas cultivadas em substrato vermiculita; e (I) Plantas de arroz cultivadas em solo em casa de vegetação.

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

5. Extração de DNA das plantas de arroz

A extração de DNA foi realizada conforme o protocolo PureGene desenvolvido por N.M. Upadhyaya (CSIRO Plant Industry). O DNA de plantas transformadas e não-transformadas foi isolado através de maceração das folhas de arroz em nitrogênio líquido e posterior homogeneização do tecido. Ao material macerado foram adicionados 600 µl de solução de lise de células (TE – Tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8.0 – com 1 % SDS). A mistura foi incubada por 1 hora a 65 °C e centrifugada por 3 min a 13000 g. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, ao qual foi adicionado 200 µl de solução de precipitação de proteínas (Acetato de amônio 6 M). A seguir, a mistura foi agitada no vortex por 20 segundos. Após centrifugação por 5 min a 13000 g, 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 min. O sobrenadante resultante da centrifugação por 20 min a 13000 g foi descartado e 350 µl de etanol 70 % foram adicionados ao tubo de microcentrífuga para lavagem do DNA. Após centrifugação por 5 min a 13000 g e descarte do sobrenadante, o precipitado foi seco a 37 °C. O DNA extraído foi ressuspendido em 40 µl de água ultra pura estéril.

6. Seleção das plantas transformadas

As plantas regeneradas, cultivadas em vermiculita, foram analisadas por PCR para determinar se houve integração do transgene no genoma do arroz.

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

7. Extração de RNA das plantas de arroz

Para extração de RNA, 100 mg de folhas de arroz não-transformadas e transformadas foram maceradas em nitrogênio líquido com ajuda de um pistilo e homogeneizadas em 1 ml de reagente Trizol (Invitrogen®), seguindo as instruções do fabricante para a obtenção do RNA total. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro com absorvância de 260 nm.

8. Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima M-MLV RT (Promega®), seguindo as instruções do fabricante. A reação da transcriptase reversa foi feita para um volume final de 50 µl. Um total de 2 µg de RNA foi utilizado na reação, com 0,5 µM de Poli 24TV, 10 mM dNTP, tampão 5 X e 200 U/µl da enzima M-MLV RT, completando o volume final com água. A solução estoque foi então preparada diluindo 10 vezes o volume final de 50 µl obtido na síntese de cDNA. Para as reações de PCR em Tempo Real, a solução estoque foi diluída 10 vezes (diluição final 1:100).

9. Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real

A análise de expressão foi realizada através de PCR em Tempo Real quantitativa (RT-qPCR). As análises foram realizadas em quadruplicatas em um aparelho StepOnePlus Real Time PCR system (Applied Biosystems®) usando dois genes como controles internos: *OsFDH* – formaldeído desidrogenase (TIGR LOC_Os02g57040) e *OseF* - fator de alongação Tu (TIGR LOC_Os03g08020) (apêndice B). As condições de reação seguiram os seguintes parâmetros: uma etapa de desnaturação inicial de 5 min a 94 °C, seguida por 45 ciclos de 10 s a 94 °C, 15 s a 60 °C, e 15 s a 72 °C. Após a amplificação, as amostras foram mantidas por 2 min a 40 °C para reanelamento e então aquecidas de 64 até 99 °C com uma taxa de incremento de 0,1 °C/s para aquisição de dados e obtenção da curva de desnaturação. As reações foram feitas em um volume final de 25 µl, sendo os mesmos compostos de 12,5 µl de cada amostra de transcrição reversa, 2,5 µl de tampão PCR 10x (Invitrogen®), 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µl de dNTPs 5 mM, 0,5 µl de *primers* específicos 5 µM, 3,45 µl de água ultra pura, 4,0 µl de

SYBR Green (1:100.000, Molecular Probes), e 0,05 µl de Platinum Taq DNA polimerase (5 U/µl, Invitrogen). A temperatura de fusão de todos os *primers* foi ajustada para 60 °C.

Os dados foram analisados através de uma quantificação relativa dos produtos amplificados usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001) utilizando o intercalante fluorescente SYBR-green para detecção. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student para comparar as diferenças na expressão de pares. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

10. Caracterização de plantas silenciadas

Em todos os experimentos descritos, as plantas foram cultivadas em casa de vegetação com fotoperíodo de 12 h a 28 °C e intensidade luminosa de $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

A caracterização fenotípica foi feita por análise visual das fases de desenvolvimento das plantas e da contagem direta do número de panículas e de flores.

11. Análise bioquímica das plantas APx4s

As análises bioquímicas foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Joaquim Albenísio da Silveira, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Amostras de folhas de plantas não-transformadas e plantas APx4s foram maceradas em nitrogênio líquido e a extração foi realizada com 3 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,8 contendo 0,1 mM de EDTA e 1 mM de ascorbato. Após a filtração, o homogeneizado foi centrifugado e o extrato obtido foi utilizado para determinar as diferentes atividades enzimáticas. O conteúdo protéico foi quantificado de acordo com Bradford (1976), usando BSA como padrão.

Para determinar a atividade de Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) verificou-se a oxidação de peróxido de hidrogênio a 240 nm. A reação foi iniciada adicionando 50 µl de extrato enzimático em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 e 20 mM de peróxido de hidrogênio. A atividade de CAT foi determinada medindo o decréscimo na absorvância a 240 nm, a 30 °C após 60 s (Havir e McHale, 1987).

A atividade de Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi determinada pela inibição da produção de formazane azul por meio da fotorredução de NBT. A reação continha 100 µl de extrato enzimático, 13 mM de L-metionina, 75 µM de *p-nitro blue tetrazolium chloride* (NBT), 100 µM EDTA e 20 µM de riboflavina dissolvida em 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8 em um volume final de 2 ml. A reação ocorreu em câmara iluminada por lâmpada fluorescente de 30 W a 25 °C cessando em 5 min depois de desligá-la (van Rossum et al., 1997). O formazane azul produzido pela fotorredução de NBT foi medido pelo aumento da absorbância a 560 nm. Uma unidade da atividade de SOD foi definida como a quantidade de enzima requerida para inibir 50 % da fotorredução de NBT em comparação com amostras sem extrato da planta.

A atividade de Ascorbato peroxidase (APx, EC.1.11.1.11) foi quantificada pela oxidação de ascorbato através do decréscimo na absorbância a 290 nm de acordo com Nakano e Asada (1981). A reação continha 0,5 mM de ascorbato, 0,1 mM de EDTA dissolvidos em 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0 e 100 µl de extrato enzimático. A reação foi iniciada adicionando-se 30 mM de peróxido de hidrogênio. A atividade de APx foi determinada monitorando o decréscimo na absorbância a 290 nm, a 30 °C após 60 s.

A quantificação de peróxido de hidrogênio foi realizada de acordo com Gay et al. (1999) adaptado, usando o método baseado na reação de hidroperóxidos com laranja xilenol-férrico. Amostras de folhas frescas foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,4, contendo 5 mM de KCN por 5 min. O homogeneizado foi filtrado, centrifugado e o sobrenadante foi imediatamente usado para a determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio. Na reação foram adicionados 100 µl de extrato proteico, 100 µM de FeSO₄, 250 µM de (NH₄)₂SO₄, 100 µM de laranja xilenol e 99 mM de sorbitol. A mistura foi incubada por 30 min, 25 °C e a leitura foi feita a 560 nm.

O conteúdo total de clorofila foi determinado após a extração da clorofila em etanol 90 %. O conteúdo foi medido através de espectrofotometria a 665 nm. A quantidade de pigmento foi calculada usando a equação proposta por Lichtenthaler e Wellburn (1983).

12. Análise de expressão dos genes *OsAPx3* e *OsAPx4*

Para análise do padrão de expressão dos genes *OsAPx3* e *OsAPx4* foram realizados experimentos de RT-qPCR.

Para este experimento utilizou-se plantas de arroz não-transformadas oriundas de sementes. Sementes de arroz foram higienizadas e germinadas em papel filtro e posteriormente, as plântulas emergidas foram transferidas para substrato vermiculita. Tecidos de folhas e raízes foram coletados em cada fase, correspondendo aos 7, 14 e 30 dias após a germinação.

Para análise da expressão dos genes peroxissomais também foi realizada uma coleta de folhas de plantas de arroz não-transformadas, cultivadas em casa de vegetação, com idades de dois, três e quatro meses.

Para avaliação do nível de expressão dos genes nas fases reprodutivas, sementes de arroz NT foram higienizadas e germinadas em papel filtro. Após, as plântulas foram transferidas para vasos contendo solo e cultivadas em casa de vegetação até a fase de coleta. Foram realizadas coletas em seis fases diferentes do desenvolvimento da panícula, baseadas em análises morfológicas descritas no artigo de Counce et al. (2000). As fases coletadas foram R2, R3, R4, R5, R6 e R7.

13. Análise do padrão de expressão da sequência promotora dos genes *OsAPx3* e *OsAPx4*

Este experimento foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Jorge Mariath e o Dr. Adriano Silvério do Laboratório de Anatomia Vegetal (UFRGS).

Para verificar o padrão de expressão da região promotora dos genes *OsAPx3* e *OsAPx4* foi isolada uma sequência de aproximadamente 2 kb anterior ao sítio de iniciação da tradução referente a cada gene, clonada no vetor de entrada pENTR e recombinada no vetor para estudo de promotores pHGWFS7 (Karimi et al., 2005), o qual possui dois genes repórteres, *gus* e *gfp* e o gene de seleção *hpt*, que confere resistência à higromicina (Figura 8). A clonagem dos insertos foi realizada utilizando células de *Escherichia coli* termocompetentes cepa TOP10. Foram adicionados à bactéria 1,5 µl da recombinação e o choque térmico ocorreu com 42 °C por 90 s e gelo. Após a transformação, meio LB (Invitrogen®) foi adicionado à bactéria e a suspensão foi incubada por 45 min a 37 °C. Posteriormente, essa suspensão bacteriana foi semeada

em meio LB ágar (Invitrogen®) suplementado com 100 µg/ml de espectinomicina. A inserção correta das sequências promotoras nos vetores foi confirmada por sequenciamento.

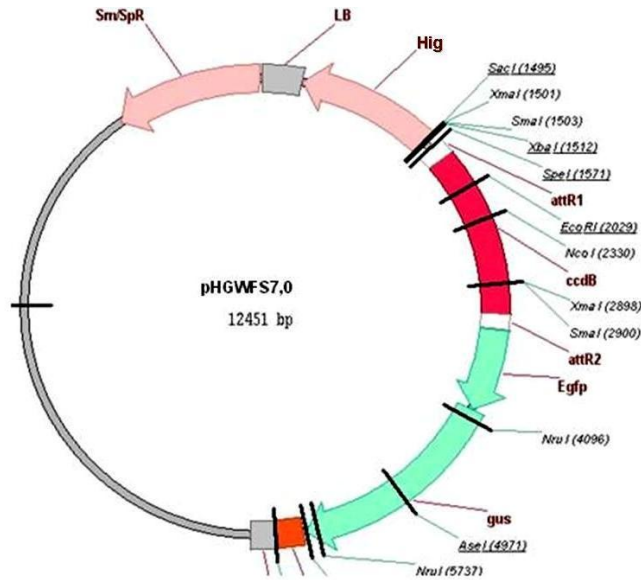


Figura 8. Vetor pHGWFS7 para estudo das sequências promotoras de genes de plantas (Karimi et al., 2005).

Cada vetor contendo a sequência promotora dos genes *OsAPx3* e *OsAPx4* foi utilizado para a transformação de plantas de arroz (conforme descrito no ítem 4). Os vetores foram denominados de pProm3, para o estudo da sequência promotora do gene *OsAPx3*, e pProm4, para o estudo da sequência promotora do gene *OsAPx4*. Após a regeneração das plantas transformadas, segmentos de folhas, raízes, caules e panícula foram coletados e analisados por ensaios histoquímicos com *X-Gluc* (Fermentas®), substrato da enzima β-glucuronidase codificada pelo gene *Gus*, de acordo com Jefferson et al. (1987), com algumas modificações.

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

foram clareados com uma sequência de etanol, iniciada com etanol 30% até etanol 70% e emblocados em plástico (Terasaka et al., 2005). Os tecidos foram cortados em 10 μ M e analisados em microscópio.

14. Análise de expressão dos genes *OsAPx3* e *OsAPx4* por hibridização *in situ*

O experimento de hibridização *in situ* foi realizado no Laboratório de Genética Molecular de Plantas da Universidade Federal do Rio de Janeiro em colaboração com o Prof. Dr. Márcio Alves Ferreira. Este experimento foi realizado segundo o protocolo de Jackson (1991), com modificações.

Flores de arroz em dois estágios de desenvolvimento, R0 e R2 (Counce et al., 2000), foram coletadas e fixadas em paraformaldeído 4% (Sigma®), desidratadas, emblocadas em paraplast (Sigma®), cortadas em fatias de 10 μ M, e anexadas a lâminas ProbeOn Plus (Fisher Biotechnology®). Para verificar a presença de RNA nas amostras fixadas em lâminas foi realizado o teste com Acridine Orange, que permite a visualização por fluorescência do RNA.

Sondas de RNA antisense foram preparadas para os dois genes, *OsAPx3* e *OsAPx4*, e para o gene *OsAP3* (que codifica o fator de transcrição APETALA3) como controle positivo. Uma sonda sense foi preparada para o gene *OsAPx4* como controle negativo. Foram selecionadas regiões de aproximadamente 400 pb destes genes para síntese das sondas, amplificadas por PCR utilizando *primers* específicos (apêndice A) e clonadas no vetor pGEM T-easy (Promega – Figura 9), que possui sítio de ligação para a enzima T7 RNA polimerase. A clonagem dos insertos foi realizada utilizando células de *E. coli* cepa TOP10 termocompetentes. Foram adicionados à bactéria 1,5 μ l do produto da reação de ligação. Essa mistura foi submetida a um choque térmico de 42 °C por 90 s, e em seguida incubada no gelo. Após a transformação, foi adicionado à bactéria meio LB, incubada por 45 min a 37 °C e, posteriormente, plaqueada em meio LB ágar suplementado com 100 μ g de ampicilina. A inserção correta das sequências nos vetores foi confirmada por sequenciamento. Foi realizada uma reação de PCR para amplificar a região do vetor contendo o sítio de ligação para a enzima T7 RNA polimerase e a região da sonda, utilizando os *primers* M13 *forward* (M13F: 5' GTAAAACGACGGCCAGT) e M13 *reverse* (M13R: 5' AACAGCTATGACCATG). Para a preparação de sondas marcadas com digoxigenina foi utilizado o DIG RNA

Labeling Mix (Roche), 1 µg do produto de PCR e 2 U de T7 RNA polimerase. Lâminas foram incubadas com as sondas em tampão de hibridização, lavadas e a detecção foi feita utilizando o anticorpo Anti-Digoxigenin-AP (Roche) com o substrato BM Purple (Roche). As imagens foram fotografadas em microscópio Leica DMRB.

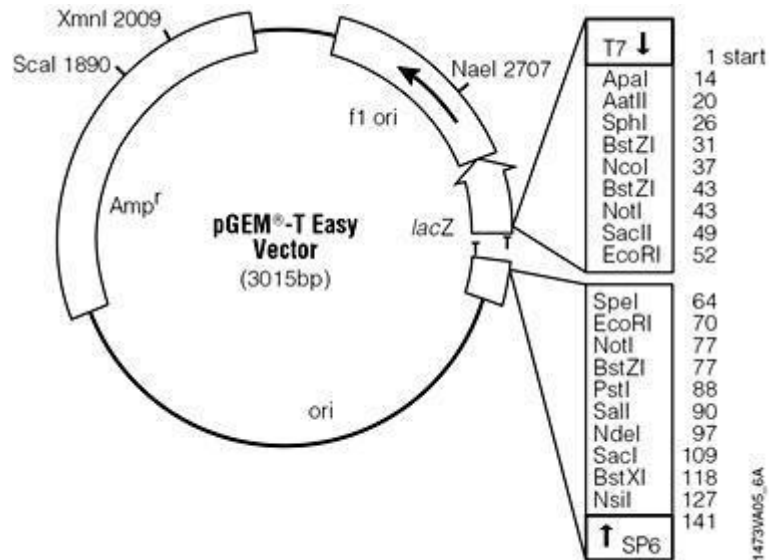


Figura 9. Vetor pGEM T-Easy (Promega®), contendo o sítio para a T7 RNA polimerase que permite a reação de transcrição *in vitro* para síntese de sondas de RNA.

15. Análises de genes marcadores de senescência

Para verificar se o processo de senescência sofreu alteração nas plantas transformadas, seis genes já descritos na literatura como modulados pela senescência foram analisados nas plantas transformadas e não-transformadas. A expressão relativa destes genes foi avaliada através de RT-qPCR, utilizando tecidos de folhas de plantas de dois, três e quatro meses de idade.

A expressão destes genes também foi analisada em folhas de plantas em três diferentes estágios de desenvolvimento. Duas plantas não-transformadas e duas plantas APx4s foram utilizadas neste experimento. Três folhas de cada planta, a folha mais velha, uma folha intermediária e a folha mais jovem, foram coletadas e a expressão destes genes em tecidos de folhas foi analisada por RT-qPCR.

Os seis genes selecionados foram: *Os12* (TIGR LOC_Os04g52450) - aminotransferase (Lee et al., 2001), *OsNAP* (TIGR LOC_Os03g21060) – no apical

meristem (Guo e Gan, 2006), *OsWRKY113* (TIGR LOC_Os06g06360) - WRKY DNA-binding domain (Zentgraf et al., 2010), *OsLip* (TIGR LOC_Os01g51360) – lipase (Lim et al., 2007), *OsRbcL* (TIGR LOC_Os10g21268) – subunidade grande da rubisco (Lim et al., 2007) e *OsIM* (TIGR LOC_Os04g57320) – immutans (Rosso et al., 2006). A sequência dos *primers* encontra-se no apêndice B.

CAPÍTULO 1

ISOFORMAS CITOSÓLICAS DE ASCORBATO PEROXIDASE DE ARROZ (APx1 e APx2)

Neste capítulo serão apresentados os resultados referentes aos estudos de caracterização das isoformas citosólicas de ascorbato peroxidase (*OsAPx1* e *OsAPx2*).

Como previamente relatado, o estudo das isoformas citosólicas de APx foi iniciado pelo nosso grupo em 2006, quando foram obtidas plantas transgênicas silenciadas para os genes *OsAPx1* (plantas APx1s), *OsAPx2* (plantas APx2s) e o silenciamento duplo dos genes *OsAPx1* e *OsAPx2* (plantas APx1/2s). Estas plantas foram caracterizadas molecularmente e fenotípicamente, resultando no artigo publicado em 2010, intitulado: “Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice” (Rosa et al., 2010).

Neste trabalho foi demonstrado que existem diferenças fenotípicas entre as três plantas silenciadas, sendo que o silenciamento de um único gene de APx citosólico gera plantas com fenótipo anão e estéril. Entretanto, plantas duplamente silenciadas (APx1/2s) apresentam fenótipo normal, semelhante ao da planta não-transformada.

As plantas APx1/2s apresentaram algum mecanismo compensatório que as permitiram manter o crescimento e desenvolvimento normais. Aparentemente, este mecanismo compensatório não foi ativado nas plantas APx1s e APx2s. Para tentar identificar as vias ativadas nas plantas APx1/2s que compensam a falta destas isoformas, no presente trabalho foi realizada uma análise de expressão global utilizando experimentos de microarranjo e de proteômica.

Este estudo resultou em um artigo intitulado: “Modulation of genes related to specific metabolic pathways in response to cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants”, aceito no periódico *Plant Biology*. O artigo é apresentado a seguir.

Modulation of genes related to specific metabolic pathways in response to cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants

C. W. Ribeiro^{1,5}, F. E. L. Carvalho², S. B. Rosa^{1,5}, M. Alves-Ferreira³, C. M. B. Andrade¹, M. Ribeiro-Alves⁴, J. A. G. Silveira², R. Margis¹ & M. Margis-Pinheiro^{5*}.

1 Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves Avenue, 9500, 915910970, Porto Alegre – RS - Brazil

2 Biochemistry and Molecular Biology Department, Federal University of Ceará, Campus do Pici, Bloco 907, CP 6004, CEP 60450-970, Fortaleza – CE - Brazil

3 Genetic Department, Federal University of Rio de Janeiro, Professor Rodolpho Paulo Rocco Avenue, 21944-970, Rio de Janeiro- RJ - Brazil

4 Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Brasil Avenue 4365 21040-900, Rio de Janeiro - RJ - Brazil

5 Genetic Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves Avenue, 9500, 915910970, Porto Alegre - RS - Brazil

*Corresponding author.

Short title: Modulation of genes in response to cytosolic ascorbate peroxidase knockdown

Corresponding author

Marcia Margis-Pinheiro

Genetic Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS - Brazil

Av. Bento Gonçalves, 9500 - 43312 - 204

CEP: 91501-970

Porto Alegre, RS

Phone: +55 51 3308-9830

E-mail: marcia.margis@ufrgs.br

Keywords: Rice, Ascorbate peroxidase, Hydrogen peroxide, Microarray, Proteomic,
Gene regulation.

ABSTRACT

As a central component of the hydrogen peroxide detoxifying system in plant cells, ascorbate peroxidases (APX) play an essential role in the control of intracellular reactive oxygen species (ROS) levels. To characterize the function of cytosolic APX isoforms (*OsAPX1* and *OsAPX2*) in the mechanisms of plant defense, *OsAPX1/2* knockdown rice plants were previously obtained. *OsAPX1/2* knockdown plants (APx1/2s) exhibited a normal phenotype and development, even though these plants showed a global reduction of APX activity and increased hydrogen peroxide accumulation. To understand how rice plants compensate for the deficiency of cytosolic APX, expression and proteomic analyses were performed to characterize the global expression pattern of the APx1/2s mutant line compared with non-transformed plants. Our results strongly suggest that deficiencies in cytosolic APX isoforms markedly alter the expression of genes associated with several key metabolic pathways, especially of genes involved in photosynthesis and antioxidant defense. These metabolic changes are compensatory because central physiological processes such as photosynthesis and growth were similar to non-transformed rice plants. Our analyses showed modulation of groups of genes and proteins related to specific metabolic pathways. Among the differentially expressed genes, the largest number corresponded to those with catalytic activity. Genes related to oxidative stress, carbohydrate metabolism and photosynthesis and transcription factor-encoding genes were also modulated. These results represent an important step toward the understanding of the role played by cytosolic APX isoforms and hydrogen peroxide in the regulation of metabolism by redox modulation in monocots.

INTRODUCTION

Since the introduction of molecular oxygen into the environment through the emergence of photosynthetic organisms, reactive oxygen species (ROS) have been the uninvited companions of aerobic life (Halliwell 2006). Through a variety of reactions, molecular oxygen produces superoxide (O_2^-), which in turn leads to the formation of hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radicals (OH^\cdot) and other molecules. ROS are also produced continuously as by-products of various metabolic pathways and are localized in different cellular compartments such as chloroplasts, mitochondria and peroxisomes (Del Rio *et al.* 2006; Navrot *et al.* 2007). Hydrogen peroxide is continually generated from various sources during normal metabolism via the Mehler reaction in chloroplasts, electron transport in mitochondria and photorespiration in peroxisomes (Neill *et al.* 2002a), but hydrogen peroxide can also be generated by specific enzymes. Studies have demonstrated that plasma membrane (PM)-located respiratory burst oxidase homologue (Rboh) enzymes, similar to the respiratory burst oxidase of mammalian neutrophil cells, are an essential ROS-producing system during the early stages of plant-microbe interactions (Apel & Hirt 2004; Torres *et al.* 2002). Accumulation of ROS affects many cellular functions, causing damage to proteins, lipids, carbohydrates, DNA and can result in cell death (Foyer & Noctor 2005).

Hydrogen peroxide, one of the most important ROS, is a toxic cellular metabolite, but also functions as a signaling molecule that mediates responses to various stimuli in both plant and animal cells. Therefore, hydrogen peroxide plays a dual role in plants, at low concentrations acting as a signaling molecule involved in acclimation and triggering tolerance to various biotic and abiotic stresses, and leading to cell death at high concentrations (Neill *et al.* 2002b; Quan *et al.* 2008). This molecule is also involved in a broad range of physiological processes as a key regulator in senescence,

photorespiration and photosynthesis, stomatal movement, cell cycle, cell growth, plant development (Bright *et al.* 2006; Foreman *et al.* 2003; Mittler *et al.* 2004; Noctor & Foyer 1998; Peng *et al.* 2005), and hydrogen peroxide modulates the transcription of several genes encoding proteins involved in metabolism, energy, transport, cell defense, cellular organization and biogenesis (Desikan *et al.* 2001).

Whether ROS will act as a damaging, protective or signaling factor depends on the delicate equilibrium between ROS production and scavenging at the proper site and time (Gratao *et al.* 2005). Under steady-state conditions, ROS molecules are scavenged by various antioxidative defense mechanisms (Foyer & Noctor 2005). All organisms have adaptive responses to oxidative stress, such as antioxidant defense enzymes, and these responses are induced by changes in the levels of the ROS, leading to activation or silencing of genes that encode defense enzymes, transcription factors or structural proteins (Dalton *et al.* 1999).

Plant cells have several mechanisms to efficiently detoxify ROS. These protective mechanisms were developed by plants during evolution to control the ROS levels and override this toxicity. Antioxidant molecules, enzymes or a more complex system of detoxification may be involved in cellular protection against ROS accumulation. Several regulatory enzymes prevent the toxic action of ROS on plant cells, including superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) (Scandalios 2002; Zhang *et al.* 1995).

APX (EC 1.11.1.11) is the main enzyme responsible for hydrogen peroxide removal, and it is found in the cytosol, peroxisome, mitochondria and chloroplasts of plant cells. This enzyme uses ascorbate as a specific electron donor to reduce hydrogen peroxide to water (Asada 1992; Li *et al.* 2007; Teixeira *et al.* 2006; Teixeira *et al.* 2004). In rice (*Oryza sativa*), a multigenic family formed by eight genes encoding APX

isoforms, have been identified. Rice APXs are found in different subcellular compartments: two cytosolic isoforms (*OsAPX1* and *OsAPX2*), two peroxisomal isoforms (*OsAPX3* and *OsAPX4*), one mitochondrial isoform (*OsAPX6*), two chloroplastic isoforms (*OsAPX7* and *OsAPX8*) and one mitochondrial/chloroplastic isoform (*OsAPX5*) (Teixeira *et al.* 2006; Teixeira *et al.* 2004).

Studies in *Arabidopsis* have demonstrated that mutants deficient in cytosolic APX are more susceptible to oxidative damage triggered by abiotic stress (Davletova *et al.* 2005). Rice plants were previously transformed with an RNAi construct specifically targeting *OsAPX1* and *OsAPX2*. A preliminary characterization of the APx1/2s lines has been previously described (Rosa *et al.* 2010). We have demonstrated that rice mutants with knockdown of both cytosolic APXs cope with abiotic stress such as salt, heat, high light and methyl viologen similar to the non-transformed (NT) plants (Bonifacio *et al.* 2011; Rosa *et al.* 2010). Although no major visible phenotypic alterations were observed between the knockdown and NT plants, RT-qPCR analysis showed that the expression of both of the cytosolic *OsAPX* genes were strongly reduced in all of the APx1/2s lines compared with the NT plants, which strongly affects the entire antioxidant system. APx1/2s-silenced plants showed increased hydrogen peroxide accumulation under both control and stress conditions (Acquadro *et al.*). In addition, analysis with T3 plants revealed that the transgenic APx1/2s line exhibited a reduction in total and cytosolic APX activities of approximately 68% and 85%, respectively, when compared with NT plants (Bonifacio *et al.* 2011). However, despite these differences, the knockdown rice plants exhibited a normal morphology in all of their organs. In addition, the silenced plants exhibited similar membrane damage (MD), increased levels of lipid peroxidation (TBARS) and similar photochemical efficiency parameters and CO₂- photosynthetic fixation rates compared with the NT plants

(Bonifacio *et al.* 2011). The compensatory antioxidative mechanism displayed by the silenced plants was associated with higher GPx activity in the cytosolic and chloroplastic fractions. The activities of CAT and guaiacol peroxidase (GPOD; type III peroxidases) were also up-regulated. None of the six studied isoforms of *OsAPX* were up-regulated under normal growth conditions. Therefore, the deficiency in cytosolic APXs was effectively compensated for by up-regulation of other peroxidases.

The present study was conducted to test the hypothesis that rice plants deficient in both cytosolic APX1 and APX2, in addition to alterations in antioxidant system invoke global gene modulation that induces a compensatory mechanism to help the cell maintain general homeostasis. Several genes were identified with altered expression in response to the lack of *OsAPX1* and *OsAPX2*, revealing pathways regulated by the cytosolic APX genes.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and growth conditions

NT and transgenic rice (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) plants were grown at 28°C under 12 h of light/dark ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in a growth chamber. APx1/2s plants were obtained as described previously (Rosa *et al.* 2010). The seeds were germinated in water at 28°C under dark conditions. Four-day-old seedlings were transferred to plastic pots containing Furlani's solution (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) and grown at 28 ± 2°C with a 12 h photoperiod for 30 days for the microarray experiments. The pH of the solution was adjusted to 5.4 with 0.1 N HCl. Volume and pH of the nutrient solution

were monitored daily and changed every four days. Thirty-day-old plants were cultivated under the same conditions for the proteomic experiments.

RNA isolation

The T1 generation of APx1/2s transgenic rice plants and control NT plants were used for microarray experiments. Leaves of 30-day-old APx1/2s and non-transgenic plants were collected and immediately frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated using the TRIZOL reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol, and the quality of the resulting RNA was assessed by gel electrophoresis. After that, RNA was purified with the RNeasy Microarray Tissue Mini Kit (Qiagen) and treated with DNase (Promega) according to the manufacturer's protocols.

Microarray experiments

Microarrays were performed with slides acquired from the "NSF Rice Oligonucleotide Array Project" (<http://www.ricearray.org/nsfarray/nsfarray.shtml>) . Each slide consisted of 25,000 oligonucleotides that corresponded to annotated genes according to the Rice Genome Annotation Project (TIGR, <http://rice.plantbiology.msu.edu/>). Tissue collection from the leaves of 30-day-old APx1/2s-knockdown and NT plants was accomplished from four independent biological experiments, and each sample consisted of a pool of four plants. Dye-labeled antisense RNA was generated from these total RNA preparations and hybridized to microarrays using the Amino Allil MessageAmpII aRNA kit (Ambion). Dyes used for labeling RNA from the individual samples were switched in the replicate experiments to reduce dye-related artifacts. Microarrays were scanned with an Axon GenePix 4200A scanner using the Gene Pix 5.0 analysis software (Axon Instruments).

Microarray data analysis

Microarray image acquisition and analysis were performed with the GenePix[®] Pro 6 Software (Molecular Devices, Inc.). Information was further analyzed using the R/Bioconductor Limma package (Smyth 2004). All data were normalized to remove any systematic biases that may arise due to the microarray technology itself rather than differences between the probes or between RNA sample-target hybrids on the arrays. This was done by the print-tip Loess method that corrects for dye bias and intensity within each group of adjacent spots printed by one pin (print-tip). Spots that had no signal detected or a signal-to-noise ratio below or equal to 2 were filtered out from the subsequent analysis. Differentially expressed genes were ranked based on its Bayesian posterior log odds calculated with the Limma package. The empirical Bayes method was used to shrink the gene-wise sample variances towards common values, thus augmenting the degrees of freedom for the individual variances. This approach combines expression ratios and their variability between replicates to rank the genes (Smyth *et al.* 2005). Statistical significance between groups of interest was assessed for the relevant linear model contrast using moderated t-statistics as implemented in the Limma package. To determine which genes were significantly modulated by the knockdown, we considered differentially expressed genes according to the following comparison: knockdown rice versus NT rice. We used Benjamini and Hochberg's method (Benjamini Y & Y 1995) to control the false discovery rate for the comparison. All analyses were performed using the freely available statistical software and graphics R environment (RDC 2008).

Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

Real-time PCR experiments were performed with cDNAs synthesized using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) and a 24-polyTV primer. After cDNA synthesis, the samples were diluted 100-fold in sterile H₂O. Subsequent PCR amplifications were performed using gene specific primers. Primers were designed to produce DNA fragments ranging from 100 to 200 bp (Supplementary material T2).

Quantitative real-time PCR assays were performed with biological and technical quadruplicates on a StepOnePlus Real Time PCR system (Applied Biosystems) using two genes as internal reference controls: *OsFDH* - formaldehyde dehydrogenase (TIGR:LOC_Os02g57040) and *OseF*- elongation factor (TIGR:LOC_Os03g08020). Each experiment was repeated four times using samples collected separately. All expression data analyses were performed after comparative quantification of amplified products using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen 2001; Schmittgen & Livak 2008), using fluorescence detection of the SYBR-green intercalating-dye. Statistical analysis was performed by Student's *t* test to compare pairwise differences in expression. The values were considered significantly different when $p < 0.05$.

Protein extraction

Leaves of 30-day-old NT and knockdown plants were collected and macerated in liquid nitrogen and homogenized in 0.5 M Tris-HCl, pH 8.3, 2% Triton X-100, 20 mM MgCl₂, 2% β-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 2.5% PEG and 1 mM EDTA buffer and incubated at 4°C for 2 hours. The supernatant was added to a solution containing 10% trichloroacetic acid (TCA) in acetone (w/v), and the mixture was incubated for 12 hours at -20°C for protein precipitation. The resulting precipitate was washed in cold acetone and dissolved in a solution containing 7 M urea and 2 M thiourea (Acquadro *et al.*

2009). The quantification of extracted proteins was conducted according to Bradford (Bradford 1976).

2D Gel and image analysis

Approximately 500 mg of protein extract was used for 2D electrophoresis analyses. The proteins were first separated according to their isoelectric points using a gradient of pH from 4 to 7 and subsequently separated according to their molecular weight in a 12.5% SDS-polyacrylamide gel. The gels were stained with Coomassie Blue and analyzed to choose the spots of interest, which were excised from the gels and digested with trypsin, according to Hellman et al. (Hellman *et al.* 1995). The solution containing the peptides was separated using a multidimensional chromatographic system. The eluted fractions were analyzed in a mass spectrometer and characterized by a source of electrospray ionisation (ESI) with two mass analyzers: a quadrupole (Q) associated with a tube to measure the flight time of ions (TOF) and an ion detector. Coupled with the online Q-TOF, a capillary chromatography system (Acquity UPLC) was used in which the sample was applied to a reverse-phase column. To perform MS analysis, the peptides eluted from the column were ionized, and then the ratio was determined based on the mass charge (m/z) of each. The spectra generated by MS/MS were processed by Proteinlynx (Micromass) and compared to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using the MASCOT software (<http://www.matrixscience.com>).

Photosynthetic gas exchange and chlorophyll fluorescence analyses

Gas exchange measurements were made using an Infra-red Gas Analyzer (LI-6400XT LI-COR Biosciences Inc., Lincoln, USA). Light was provided by a red/blue LED light

source. Net photosynthesis (P_N) and stomatal conductance (g_s) were taken under ambient CO_2 conditions (400 ppm), photon irradiance of $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a constant leaf temperature of 28°C . The Rubisco carboxylation maximum rate (V_{cmax}), maximum electron flux (J_{max}), mesophyll conductance (g_m) and light respiration (R_d) were calculated from the P_N/C_i curves obtained by varying the ambient CO_2 concentration (C_a) from 0 to 1000 ppm under a constant active photosynthetic photon flux density (PPFD) of $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, according to the methodology of Sharkey et al. 2007 (Sharkey *et al.* 2007). Photorespiration (P_r) was estimated according to the method previously described (Bagard *et al.* 2008).

Chlorophyll fluorescence was determined concurrently with gas exchange measurements using the LI-6400-40 Leaf Chamber Fluorometer (LI-COR Biosciences Inc., Lincoln, USA). The following parameters were assessed as proposed by (Baker 2008): the maximum quantum yield of photosystem II (PSII) ($F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$), the effective quantum yield of PSII ($\Delta F/F_m' = (F_m' - F_s)/F_m'$), the photochemical quenching coefficient ($qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$) and the non-photochemical quenching coefficient ($NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$). F_m and F_o are the maximum and minimum fluorescence, respectively, of dark-adapted leaves; F_m' and F_s are the maximum and steady-state fluorescence, respectively, in the light-adapted state, and F_o' is minimum fluorescence after far-red illumination of the previously light-exposed leaves. A saturating pulse of red light (0.8 s , $8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was utilized.

The electron transport flux (J), defined as the actual flux of photons driving photosystem II (PSII), was calculated from $J = (F_m' - F_s/F_m') f I_{\text{leaf}}$, where F_s is steady-state fluorescence (at $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), F_m' is the maximal fluorescence during a saturating light flash, f is the fraction of absorbed quanta used by PSII,

typically assumed to be 0.5 for C₃ plant species, I is incident photon flux density and α leaf is the leaf absorbance (0.85, according to the LI-COR manual).

RESULTS

Plant lines with knockout or silencing of APX isoforms have been generated, resulting in different phenotypes. Knockdown or knockout plants for the cytosolic isoforms generally present altered phenotypes such as dwarfism, stunted growth and late flowering (Davletova *et al.* 2005). The silencing of peroxisomal APX isoforms produced plants with altered panicle development and senescence (Ribeiro, unpublished results). Many studies, remarkably in *Arabidopsis*, have shown that mutants deficient in cytosolic APX are more susceptible to abiotic stresses (Koussevitzky *et al.* 2008; Miller *et al.* 2007). Interestingly, APx1/2s-silenced rice plants showed a similar phenotype compared to NT plants despite their higher hydrogen peroxide content (Rosa *et al.* 2010). To further demonstrate the alterations in redox homeostasis, the hydrogen peroxide content was assessed by DAB staining in silenced plants exposed to UV light (supplementary material S1). The results confirmed that APx1/2s plants have a lower ability to scavenge hydrogen peroxide.

Microarray analyses

To understand the compensatory mechanism of the silenced plants that results in a normal phenotype, we searched for genes that are responsive to cytosolic APX silencing using global microarray and proteomic analyses of APx1/2s knockdown and NT plants. A set of 58 non-redundant genes were altered in the OsAPx1/2s-silenced plant lines. Of these genes, 44 were up-regulated and 14 were down-regulated. The analysis also

showed the reduction in the transcript levels of *OsAPX1* and *OsAPX2*, confirming the knockdown of these genes in APx1/2s rice plants.

A functional classification of all differentially expressed genes is summarized in Figure 1. The values of changes in gene expression and predicted gene function of the modulated genes (based on the Rice Genome Annotation Project - <http://rice.plantbiology.msu.edu>) are shown in Table S2. Among the up- and down-regulated genes, the class with the largest number of genes was that with catalytic activity, representing 22% of the induced and 28% of the repressed genes. Genes from other functional classes were also identified, including genes associated with oxidative stress, carbohydrate metabolism, photosynthesis and transcription factors. Some of the induced and repressed genes (27% and 21%, respectively) have unknown functions and likely represent the proportion of unknown genes in the entire genome. Transcription factors such as MYB, bHLH, NAM and WRKY have been previously described as responsive to oxidative stress (Gadjev *et al.* 2006). In addition, it has also been demonstrated that photosynthesis-related genes may have altered expression in plants lacking APX and CAT in *Arabidopsis* (Rizhsky *et al.* 2002).

To validate the microarray data, the expression of 15 genes was analyzed by quantitative real-time PCR (Figure 2). The expression patterns of all fifteen genes showed good correlation between the microarray and RT-qPCR experiments. Figures 2A to C show the validation of the down-regulated genes in knockdown plants, such as the gene encoding calcium-dependent protein kinase (2A). Figures 2D to O show genes with induced expression in the APx1/2s-silenced plants, including genes encoding transcription factors (Figures 2D, 2E and 2K) and heat shock proteins (Figure 2G).

Quantitative real-time PCR analysis confirmed that the expression levels of all 15 genes were altered following knockdown of cytosolic APX genes.

Proteomic analysis

Proteomic analyses were performed to identify differentially expressed proteins in the rice cytosolic APX knockdown plants. A large number of protein spots extracted from the rice leaf were reproducibly detected through independent replicates on 2-D gels. Each protein was identified according to its molecular mass and pI. In conjunction with automated gel scanning and computer-aided image analysis, over 500 protein spots were detected and numbered on the 2-D PAGE map (data with numbered proteins not shown). To correct the variability due to staining, the spot volumes were normalized as a percentage of the total volume of all spots on the gel.

Several spots showed differences among the gels, but only the spots with coefficients of variance higher than 10% between replicates of the different groups were accepted for comparative analysis. Thus, among all protein spots detected, only forty were selected and excised from the gels for mass spectrometry analysis. Sixteen protein spots showed no match or did not have a conclusive chromatogram when compared with the NCBI database. The 26 identified proteins were classified according to their molecular function (Table 1), forming eight groups: (1) photosynthetic process, (2) response to oxidative stress, (3) phosphate metabolism, (4) carbohydrate metabolic process, (5) protein metabolic processes, (6) assistant proteins, (7) RNA degradation and (8) translation regulator. The protein group with the highest representation in the total set of identified proteins was that associated with photosynthetic processes, with 64% of the total number of proteins, followed by proteins linked to the oxidative stress response and assistant proteins, with 8% of the total protein for each. The other non-specific groups represented 4% each (Figure 3). It was also possible to identify the spots corresponding to the cytosolic APX isoforms (APX1 and APX2), confirming the knockdown of these isoforms at the protein level.

Photosynthetic and photochemical parameters

The Rubisco carboxylation maximum rate (V_{cmax}) and the maximum electron flux (J_{max}) were similar between both NT and knockdown rice plants. The stomatal (g_s) and the mesophyll (g_m) conductances and the photochemical parameters such as F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$ and qP were also similar between the plants. The values of NPQ and J , parameters related to the dissipation of excess of energy of photosystem II and with changes in the pH gradient across the thylakoid membrane, were increased in the silenced plants. The electron transport flux (J) in the photosystem II was slightly higher (approximately 10%) in the APx1/2s plants, which was associated with increased NPQ and a robust increase in the photorespiratory activity (P_r). Net CO_2 assimilation (P_N) and light respiration (R_d) rates were similar in both plants (Table 2).

DISCUSSION

Based on the combined results of microarray and proteomic analyses, several metabolic pathways were affected by cytosolic APX silencing in rice plants. As reported in Tables 1 and S2, the major pathways affected in the mutant plant were photosynthesis, antioxidant metabolism, carbohydrate metabolism, protein metabolism and other proteins with catalytic activity. The modulation of these pathways may represent a general response to higher hydrogen peroxide accumulation in the silenced plants (Acquadro *et al.* 2006). Other studies on the hydrogen peroxide plant response corroborate our results (Wan & Liu 2008; Yan *et al.* 2006).

Differentially expressed genes associated with the photosynthetic process

The knockdown of cytosolic APX isoforms led to increasing endogenous hydrogen peroxide accumulation in rice leaves (Rosa *et al.* 2010). The photosynthetic apparatus is

one of the major sources of ROS production in photosynthetic tissues, and suppression of photosynthetic activity was shown to accompany the defense response of certain plants to adverse physical conditions (Mittler *et al.* 2001). In the present analyses, 19 differentially expressed genes and proteins are associated with the photosynthetic process (Tables 1 and S2). These genes and proteins are implicated in two functional subgroups: photosynthetic photosystems I and II and the Calvin-Benson cycle.

To assess the relationship of the modulation of these genes and the acclimation processes, photosynthetic parameters were analyzed. Both knockdown and NT plants presented similar maximum Rubisco carboxylation rates (V_{cmax}) and maximum electron flux (J_{max}), a photosynthetic parameter associated with the rate of ribulose 1,5-biphosphate (RuBP) regeneration (Bagard *et al.* 2008). These results were associated with similar responses in terms of gas exchange (net CO₂ assimilation and stomatal and mesophyll conductances) and also were associated with higher Rubisco small subunit (RSS) content as revealed by proteomic analysis (Table 1). Altogether, these results suggest that the photosynthetic assimilation of CO₂ in rice deficient in cytosolic APX1/2 was unchanged by silencing, in contrast to what has been reported for other species, including *Arabidopsis* (Achard & Genschik 2009). These responses in rice indicate that silenced plants were capable of display similar photosynthetic efficiency, indicating the induction of an effective acclimation mechanism as previously suggested (Achard *et al.* 2006).

The photochemical parameters such as Fv/Fm, $\Delta F/Fm'$, qP, J and NPQ corroborate the CO₂ assimilation data, showing that changes in the expression of the proteins of the photochemical system and the Calvin-Benson cycle could also be involved in the compensatory mechanism. The Fv/Fm, $\Delta F/Fm'$ and qP parameters indicate that the functional integrity of photosystem II (the potential yield of

photosystem II), (F_v/F_m), the effective quantum yield of PSII ($\Delta F/F_m'$) and the recovery of the energy transferred as electrons (the photochemical quenching), (qP), respectively (Baker 2008), were similar in both genotypes. However, the values of J , the actual electron flux rate at photosystem II, and NPQ, a parameter related to dissipation of the excess of energy of photosystem II, were increased in the silenced plants. These data suggest that silenced plants maintain a high electron flux and dissipate the excess energy, preventing damage in the photochemical apparatus (Baker 2008). The increased expression of key proteins involved in the electron flux in the chloroplast electron transport chain, such as plastocyanin, ferredoxin and ferredoxin-NADP(H)-oxidoreductase in the APx1/2s plants, suggest that these proteins may be involved in a compensatory mechanism that permit adequate electron flux to sustain photosynthesis at the same level as the NT plants.

The increase in the electron flux could have increased the NADPH/NADP⁺ ratio (Baker 2008). This hypothesis is reinforced by increased expression of ferredoxin-NADP(H)-oxidoreductase. These results were associated also with higher photorespiratory activity in the silenced plants. Thus, the higher electron flux in the silenced plants could have been dissipated as heat (higher NPQ) and higher photorespiratory activity (P_r) (Foyer & Noctor 2009). The increased photorespiration was associated with increased expression of chloroplastic glutamine synthetase (GS) and glycine dehydrogenase, the last two enzymes in the photorespiratory pathway. Photorespiration is involved in energy dissipation and protection against oxidative stress (Foyer & Noctor 2009). Moreover, the higher expression of plastocyanins, ferredoxin, ferredoxin-NADP(H)-oxidoreductase and chloroplastic Cu-Zn SOD isoforms could also contribute to reduce the excess electrons in the photosystems, restricting potential oxidative damage.

Differentially expressed genes associated with protein metabolism

A total of 10 genes related to protein metabolism showed modulation in the cytosolic APX knockdown rice plants (Tables 1 and S2). Three genes are related to protein folding and assembly (HSP60, HSP70 and HSP81-like). The contribution of heat shock proteins (HSP) to various cellular processes including signal transduction, protein folding, protein degradation and morphological evolution has been extensively studied (Nadeau *et al.* 1993). HSP60 and HSP81-like protein were up-regulated, but HSP70 was down-regulated, indicating that these proteins may respond differently in response to hydrogen peroxide accumulation. HSPs are believed to help other proteins to maintain or regain their native conformation by stabilizing partially unfolded states (Low *et al.* 2000). Current models propose that HSPs act as ATP-independent chaperones by binding to aggregating proteins and keeping them accessible for refolding by HSP70 (and co-chaperones) and, under some circumstances, by HSP100/ClpB proteins (Larkindale *et al.* 2005). In agreement with this model, expression levels of members of the HSP70 gene family have been found to be significantly elevated in maturing microspores upon exposure of plants to HS conditions (Frank *et al.* 2009). Because these proteins are related to protein folding and assembly in response to the loss of protein structural integrity (Bohler *et al.* 2007), these results suggest that the hydrogen peroxide accumulation in APx1/2s plants may induce protective responses involving HSP proteins. Indeed, one member of the AAA⁺ family of ATPases was induced in APx1/2s-knockdown plants. This protein family is involved in resolubilizing protein aggregates (Kotak *et al.* 2007). A cytosolic member of this family was found to be essential for tolerance to high temperatures in plants (Hong & Vierling 2001). Among these proteins, an ATP-dependent Clp protease transcript was up-regulated in response

to hydrogen peroxide accumulation. This protein is an ATP-dependent enzyme and functions as a master protease that cleaves a number of proteins (Maurizi *et al.* 1990).

Taken together, the differential expression patterns of the proteins in this group suggest that the protein biosynthesis and degradation as well as folding and assembly of proteins are required for the survival and growth of rice plants in response to increased hydrogen peroxide.

Differentially expressed genes associated with oxidative stress

In addition to the reduced level of cytosolic APX isoforms, which confirms the silencing of these isoforms in APx1/2s knockdown plants, other antioxidant protein-encoding genes, such as the chloroplastic Cu/Zn SOD, peroxiredoxin, precursor of peroxidases, stress-related and glutathione-S-transferase genes, had altered expression. Changes in the SOD expression levels have been detected previously in mutant plants with reduced expression of APX (Davletova *et al.* 2005; Rizhsky *et al.* 2002; Rosa *et al.* 2010). In our previous study, the SOD enzymatic activity was increased in APx1/2s transgenic plants compared to NT plants (Rosa *et al.* 2010). In addition, we found that the activity of the Cu/Zn SOD isoform is increased in silenced plants (Carvalho, unpublished results). Silencing of the cytosolic APX isoforms in rice plants caused hydrogen peroxide accumulation and activated the antioxidant defense system. The consistent induction of SOD, peroxiredoxin and GST is likely a consequence of antioxidative responses to the oxidative stress induced in these plants. We have previously showed that the compensatory antioxidative mechanism of the APx1/2s plants is associated with increased expression of *OsGpx*, *OsCatA*, *OsCatB* and guaiacol peroxidase (GPOD; type III peroxidases), suggesting that the deficiency in cytosolic

APXs is effectively compensated for by up-regulation of other peroxidases and antioxidant enzymes (Bonifacio *et al.* 2011).

Glutathione-S-transferase (GST), which is related to oxidative stress, is also up-regulated in APx1/2s plants. The GSTs are a large group of enzymes that evolved to fulfill diverse functions. They catalyze the S-conjugation of reactive compounds with glutathione, such as the removal of lipid peroxides produced by lipid peroxidation (Foyer & Noctor 2009). GST is an antioxidative protein, and its expression is strongly enhanced by abiotic and biotic stresses (Dixon *et al.* 2002). GST expression is altered in response to hydrogen peroxide stress (Desikan *et al.* 2001; Koussevitzky *et al.* 2008; Sharkey *et al.* 2007), even in *Arabidopsis* suspension cultures (Desikan *et al.* 2000).

To further investigate other pathways related to ROS, further analyses using RT-qPCR were performed. Six genes that participate in ROS signaling, production and detoxification, including IMMUTANS (IM), NADPH oxidase (RbohD) and monodehydroascorbate reductase (MDAR), were selected for this study. The expression of these genes was analyzed in the APx1/2s knockdown plants and compared with NT plants (Figure 4).

IM gene encodes a chloroplastic alternative oxidase protein. This enzyme has quinol oxidase activity and appears to divert electrons flowing from photosystem II to photosystem I at the plastoquinone pool, using these to reduce O₂ into water (Rizhsky *et al.* 2002). In our analysis, IM was found to be significantly repressed in APx1/2s plants (Figure 4). The level of transcripts encoding IM was specifically induced in double APX and CAT antisense tobacco plants, APX antisense plants, and CAT antisense plants, as well as in NT plants growing at high light, suggesting a role for IM in preventing ROS-related damage during high light stress in plants (Rizhsky *et al.* 2002). However, IM transcript abundance was measured under various abiotic stresses, such as

hydrogen peroxide, ozone, UV light, cold and mannitol, as well as hormones such as abscisic acid and salicylic acid, and IM transcripts remained at control levels (Rosso *et al.* 2006). *Arabidopsis* plants lacking IM have enhanced photosynthesis and increased Rubisco activity, perhaps to maximize the growth and reproductive fitness of *im* plants, as they exhibit a variegated phenotype (Aluru *et al.* 2007). Thus, IM may function to keep the PQ pool oxidized during chloroplast biogenesis and help assemble the photosynthetic apparatus. In our study, we found that the IM gene was repressed in APx1/2s plants. It is possible that in the APx1/2s plants, the repression of the IM gene would allow higher activity of proteins belonging to PSI and PSII, in agreement with our proteomics analysis (Table 1).

A NADPH oxidase (Rboh for respiratory burst oxidase homologs; RbohD) was also repressed in APx1/2s plants. The NADPH oxidase is an integral plasma membrane enzyme that oxidizes cytosolic NADPH, transferring an electron across the membrane to generate superoxide in the cell wall. This superoxide can be rapidly dismutated to hydrogen peroxide that is thought to diffuse back into the cell, providing a possible cytosolic regulator (Swanson & Gilroy 2010). Several studies have shown that RbohD is responsible for hydrogen peroxide production, as it is induced in response to different treatments, such as after cryptogein treatment of tobacco leaves (Lherminier *et al.* 2009), bacterial infection (Lina *et al.* 2010), in the guard cells of ozone-fumigated *Arabidopsis* leaves (Joo *et al.* 2005) and with salt treatment (Achard *et al.* 2008). The silencing of cytosolic APX isoforms in rice plants caused changes in the expression of RbohD gene, which disrupts ROS homeostasis. It was also suggested that Rboh proteins function as positive amplifiers by enhancing the ROS signal generated during stress and maintaining this signal in an active state for a longer period of time (Mittler *et al.* 2004).

The monodehydroascorbate reductase family was analyzed in the cytosolic APX-knockdown plants. *OsMDAR4* gene expression was not detected in our RT-qPCR experiments. The others members of this family were also analyzed. In APx1/2s plants, all MDAR members were repressed. As a result, we observed a decrease in the hydrogen peroxide detoxification pathway in APx1/2s-knockdown plants.

Differentially expressed genes associated with other functions

Others genes classified in different molecular function groups were also modulated. Some of these genes should be highlighted, such as the terpene synthases, which are key enzymes responsible for the biosynthesis of the complex chemical defense arsenal (i.e., terpenes) of plants and microorganisms (Greenhagen *et al.* 2006; Kampranis *et al.* 2007). Another example is the malate dehydrogenase (MDH), which catalyzes the interconversion of malate to oxaloacetate (Chapman *et al.* 1999) coupled to reduction or oxidation of the NAD pool. This enzyme participates in the citric acid cycle and gluconeogenesis (Tomaz *et al.* 2010) and has a crucial role in plant metabolism. MDH induction in response to stress (Becker *et al.* 2006; Bohler *et al.* 2007) and herbicides (Ahsan *et al.* 2008) has been shown in different plants species. Another enzyme involved in carbohydrate metabolism, the 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD), which promotes the decarboxylating reduction of 6-phosphogluconate into ribulose 5-phosphate in the presence of NADP (Broedel & Wolf 1990), was also found to be induced in the microarray analysis. The induction of NADP-MDH and 6PGD suggest that glucose catabolism could partly be due to required energy and reducing power for repair of damage caused by oxidative molecules. A carbohydrate transporter identified in the microarray analysis had reduced expression in comparison with NT plants,

indicating that the carbohydrate metabolic process was affected in APx1/2s-knockdown plants.

Four distinct transcription factors that are related to stress and plant development had increased expression in the APx1/2s plants: Zn finger A20/AN1, no apical meristem (NAM) protein, basic helix-loop-helix (bHLH) and a GRAS family transcription factor. The fact that genes encoding transcription factors were induced by hydrogen peroxide accumulation in APx1/2s knockdown plants might suggest that these transcription factors mediate further downstream hydrogen peroxide responses and that several other genes are likely to be induced at later times. Indeed, transcription factors have been reported to be rapidly induced during defense responses (Durrant *et al.* 2000; Rushton & Somssich 1998).

Taken together, our data demonstrated that reduced expression of cytosolic APX genes in rice can modulate the expression of a specific subset of genes. The increased hydrogen peroxide accumulation in the knockdown plants altered the pattern of cellular proteins. The putative functions and changes in abundance of the 58 genes and 24 proteins identified in this work provided an overview of the complex gene network involved in oxidative stress responses. The imbalance in redox homeostasis affected essential processes of plant metabolism. In our model, some components of the photosynthetic process were affected; the plant modulated the metabolism to adapt to this new condition by activating alternative pathways, such as photorespiration and glucose metabolism. Transcription factors involved in development were also modulated. Genes involved in the antioxidant defense metabolism were induced to compensate for the reduction of cytosolic APX and to promote a decrease in the amount of hydrogen peroxide accumulated. In conclusion, our findings demonstrated that the

rice genome has a high degree of plasticity and responds to silencing of cytosolic APX isoforms by a very efficient compensatory mechanism.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Dr. Paulo Mascarello Bisch from LABMICRO for assistance with the microarray scan, and we thank the members of the UNIPROTE-MS for assistance in proteomics. We thank Dr. Giancarlo Pasquali for critical reading of the manuscript. The authors also thank Silvia Richter for her technical assistance. This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de apoio a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and the Brazilian National Council of Technological and Scientific Development (CNPq). M. Margis-Pinheiro and R. Margis were supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil (302684/2005-0 and 303967/2008-0).

REFERENCES

- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., and Harberd, N.P. (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, 311(**5757**), 91-94.
- Achard, P., and Genschik, P. (2009) Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of Experimental Botany*, 60(**4**), 1085-1092.
- Achard, P., Renou, J.P., Berthome, R., Harberd, N.P., and Genschik, P. (2008) Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Current Biology*, 18(**9**), 656-660.

- Acquadro, A., Falvo, S., Mila, S., Giuliano Albo, A., Comino, C., Moglia, A., and Lanteri, S. (2009) Proteomics in globe artichoke: protein extraction and sample complexity reduction by PEG fractionation. *Electrophoresis*, 30(9), 1594-1602.
- Ahsan, N., Lee, D.G., Lee, K.W., Alam, I., Lee, S.H., Bahk, J.D., and Lee, B.H. (2008) Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. *Plant Physiology Biochemistry*, 46(12), 1062-1070.
- Aluru, M.R., Stessman, D.J., Spalding, M.H., and Rodermel, S.R. (2007) Alterations in photosynthesis in Arabidopsis lacking IMMUTANS, a chloroplast terminal oxidase. *Photosynthesis Research*, 91(1), 11-23.
- Apel, K., and Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
- Asada, K. (1992) Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia. Plantarum*, 85, 235–241.
- Bagard, M., Le Thiec, D., Delacote, E., Hasenfratz-Sauder, M.P., Banvoy, J., Gerard, J., Dizengremel, P., and Jolivet, Y. (2008) Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. *Physiologia. Plantarum*, 134(4), 559-574.
- Baker, N.R. (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 89-113.
- Becker, B., Holtgreffe, S., Jung, S., Wunrau, C., Kandlbinder, A., Baier, M., Dietz, K.J., Backhausen, J.E., and Scheibe, R. (2006) Influence of the photoperiod on redox regulation and stress responses in Arabidopsis thaliana L. (Heynh.) plants under long- and short-day conditions. *Planta*, 224(2), 380-393.

- Benjamini Y, and Y, H. (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B*, 57(1), 289-300.
- Bohler, S., Bagard, M., Oufir, M., Planchon, S., Hoffmann, L., Jolivet, Y., Hausman, J.F., Dizengremel, P., and Renaut, J. (2007) A DIGE analysis of developing poplar leaves subjected to ozone reveals major changes in carbon metabolism. *Proteomics*, 7(10), 1584-1599.
- Bonifacio, A., Martins, M.D., Ribeiro, C.W., Fontenele, A.V., Carvalho, F.E., Margis-Pinheiro, M., and Silveira, J.A. (2011) Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. *Plant and Cell Environment*.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S., and Neill, S.J. (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal*, 45(1), 113-122.
- Broedel, S.E., Jr., and Wolf, R.E., Jr. (1990) Genetic tagging, cloning, and DNA sequence of the *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 gene (gnd) encoding 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Journal of Bacteriology*, 172(7), 4023-4031.
- Chapman, A.D., Cortes, A., Dafforn, T.R., Clarke, A.R., and Brady, R.L. (1999) Structural basis of substrate specificity in malate dehydrogenases: crystal structure of a ternary complex of porcine cytoplasmic malate dehydrogenase, alpha-ketomalonate and tetrahydroNAD. *Journal of Molecular Biology*, 285(2), 703-712.

- Dalton, T.P., Shertzer, H.G., and Puga, A. (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39, 67-101.
- Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shengqiang, Z., Oliver, D.J., Coutu, J., Shulaev, V., Schlauch, K., and Mittler, R. (2005) Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *Plant Cell*, 17(1), 268-281.
- Del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M., and Barroso, J.B. (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology*, 141(2), 330-335.
- Desikan, R., Neill, S.J., and Hancock, J.T. (2000) Hydrogen peroxide-induced gene expression in Arabidopsis thaliana. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(5), 773-778.
- Desikan, R., S, A.H.-M., Hancock, J.T., and Neill, S.J. (2001) Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology*, 127(1), 159-172.
- Dixon, D.P., Laphorn, A., and Edwards, R. (2002) Plant glutathione transferases. *Genome Biology*, 3(3), REVIEWS3004.
- Durrant, W.E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D. (2000) cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell*, 12(6), 963-977.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D., Davies, J.M., and Dolan, L. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422(6930), 442-446.

- Foyer, C.H., and Noctor, G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 17(7), 1866-1875.
- Foyer, C.H., and Noctor, G. (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidant & Redox Signaling*, 11(4), 861-905.
- Frank, G., Pressman, E., Ophir, R., Althan, L., Shaked, R., Freedman, M., Shen, S., and Firon, N. (2009) Transcriptional profiling of maturing tomato (*Solanum lycopersicum* L.) microspores reveals the involvement of heat shock proteins, ROS scavengers, hormones, and sugars in the heat stress response. *Journal of Experimental Botany*, 60(13), 3891-3908.
- Gadjev, I., Vanderauwera, S., Gechev, T.S., Laloi, C., Minkov, I.N., Shulaev, V., Apel, K., Inze, D., Mittler, R., and Van Breusegem, F. (2006) Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 141(2), 436-445.
- Gratao, P.L., Polle, A., Lea, P.J., and Azevedo, R.A. (2005) Making the life of heavy metal stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32, 481 - 494.
- Greenhagen, B.T., O'Maille, P.E., Noel, J.P., and Chappell, J. (2006) Identifying and manipulating structural determinates linking catalytic specificities in terpene synthases. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*, 103(26), 9826-9831.
- Halliwell, B. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141(2), 312-322.

- Hellman, U., Wernstedt, C., Gonez, J., and Heldin, C.H. (1995) Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Analytical Biochemistry*, 224(1), 451-455.
- Hong, S.W., and Vierling, E. (2001) Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *The Plant Journal*, 27(1), 25-35.
- Joo, J.H., Wang, S., Chen, J.G., Jones, A.M., and Fedoroff, N.V. (2005) Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein alpha and beta subunits in the Arabidopsis oxidative stress response to ozone. *Plant Cell*, 17(3), 957-970.
- Kampranis, S.C., Ioannidis, D., Purvis, A., Mahrez, W., Ninga, E., Katerelos, N.A., Anssour, S., Dunwell, J.M., Degenhardt, J., Makris, A.M., Goodenough, P.W., and Johnson, C.B. (2007) Rational conversion of substrate and product specificity in a *Salvia* monoterpene synthase: structural insights into the evolution of terpene synthase function. *Plant Cell*, 19(6), 1994-2005.
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Doring, P., Vierling, E., and Scharf, K.D. (2007) Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion of Plant Biology*, 10(3), 310-316.
- Koussevitzky, S., Suzuki, N., Huntington, S., Armijo, L., Sha, W., Cortes, D., Shulaev, V., and Mittler, R. (2008) Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(49), 34197-34203.
- Larkindale, J., Mishkind, M., and Vierling, E. (2005) Plant responses to high temperature: Oxford: Blackwell Publishing.

- Lherminier, J., Elmayan, T., Fromentin, J., Elaraqui, K.T., Vesa, S., Morel, J., Verrier, J.L., Cailleteau, B., Blein, J.P., and Simon-Plas, F. (2009) NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production: subcellular localization and reassessment of its role in plant defense. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 22(7), 868-881.
- Li, H.B., Qin, Y.M., Pang, Y., Song, W.Q., Mei, W.Q., and Zhu, Y.X. (2007) A cotton ascorbate peroxidase is involved in hydrogen peroxide homeostasis during fibre cell development. *New Phytologist*, 175(3), 462-471.
- Lina, Y.H., Huangb, H.E., Wuc, F.S., Gerd, M.J., Liaoa, P.L., Chena, Y.R., Tzenge, K.C., and Feng, T.Y. (2010) Plant ferredoxin-like protein (PFLP) outside chloroplast in Arabidopsis enhances disease resistance against bacterial pathogens *Plant Science*, 179, 450–458
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Low, D., Brandle, K., Nover, L., and Forreiter, C. (2000) Cytosolic heat-stress proteins Hsp17.7 class I and Hsp17.3 class II of tomato act as molecular chaperones in vivo. *Planta*, 211(4), 575-582.
- Maurizi, M.R., Clark, W.P., Katayama, Y., Rudikoff, S., Pumphrey, J., Bowers, B., and Gottesman, S. (1990) Sequence and structure of Clp P, the proteolytic component of the ATP-dependent Clp protease of Escherichia coli. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(21), 12536-12545.
- Miller, G., Suzuki, N., Rizhsky, L., Hegie, A., Koussevitzky, S., and Mittler, R. (2007) Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant

- development, and response to abiotic stresses. *Plant Physiology*, 144(4), 1777-1785.
- Mittler, R., Merquiol, E., Hallak-Herr, E., Rachmilevitch, S., Kaplan, A., and Cohen, M. (2001) Living under a "dormant" canopy: a molecular acclimation mechanism of the desert plant *Retama raetam*. *The Plant Journal*, 25(4), 407-416.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490-498.
- Nadeau, K., Das, A., and Walsh, C.T. (1993) Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(2), 1479-1487.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., and Jaquot, J.P. (2007) Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiology Plantarum*, 129, 185-195.
- Neill, S., Desikan, R., and Hancock, J. (2002a) Hydrogen peroxide signaling *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 388-395.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., and Hancock, J.T. (2002b) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1237-1247.
- Noctor, G., and Foyer, C.H. (1998) A re-evaluation of the ATP: NADPH budget during C3 photosynthesis. A contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity? *Journal of Experimental Botany*, 49, 1895 -1908.
- Peng, C.L., Ou, Z.Y., Liu, N., and Lin, G.Z. (2005) Response to high temperature in flag leaves of super high-yielding rice Pei'ai 64S/E32 and Liangyoupeijiu. *Rice Science*, 12, 179-186.

- Quan, L.J., Zhang, B., Shi, W.W., and Li, H.Y. (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(1), 2-18.
- RDC, T. (2008) R: A Language and Environment for Statistical Computing. In R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rizhsky, L., Hallak-Herr, E., Van Breusegem, F., Rachmilevitch, S., Barr, J.E., Rodermel, S., Inze, D., and Mittler, R. (2002) Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *The Plant Journal*, 32(3), 329-342.
- Rosa, S.B., Caverzan, A., Teixeira, F.K., Lazzarotto, F., Silveira, J.A., Ferreira-Silva, S.L., Abreu-Neto, J., Margis, R., and Margis-Pinheiro, M. (2010) Cytosolic APX knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. *Phytochemistry*, 71(5-6), 548-558.
- Rosso, D., Ivanov, A.G., Fu, A., Geisler-Lee, J., Hendrickson, L., Geisler, M., Stewart, G., Krol, M., Hurry, V., Rodermel, S.R., Maxwell, D.P., and Huner, N.P. (2006) IMMUTANS does not act as a stress-induced safety valve in the protection of the photosynthetic apparatus of Arabidopsis during steady-state photosynthesis. *Plant Physiology*, 142(2), 574-585.
- Rushton, P.J., and Somssich, I.E. (1998) Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Current Opinion of Plant Biology*, 1(4), 311-315.
- Scandalios, J.G. (2002) The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(9), 483-486.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108.

- Sharkey, T.D., Bernacchi, C.J., Farquhar, G.D., and Singaas, E.L. (2007) Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C(3) leaves. *Plant and Cell Environment*, 30(9), 1035-1040.
- Smyth, G.K. (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Application in Genetics and Molecular Biology*, 3, Article3.
- Smyth, G.K., Michaud, J., and Scott, H.S. (2005) Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics*, 21(9), 2067-2075.
- Swanson, S., and Gilroy, S. (2010) ROS in plant development. *Physiologia Plantarum*, 138(4), 384-392.
- Teixeira, F.K., Menezes-Benavente, L., Galvao, V.C., Margis, R., and Margis-Pinheiro, M. (2006) Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta*, 224(2), 300-314.
- Teixeira, F.K., Menezes-Benavente, L., Margis, R., and Margis-Pinheiro, M. (2004) Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. *Journal of Molecular Evolution*, 59(6), 761-770.
- Tomaz, T., Bagard, M., Pracharoenwattana, I., Linden, P., Lee, C.P., Carroll, A.J., Stroher, E., Smith, S.M., Gardstrom, P., and Millar, A.H. (2010) Mitochondrial malate dehydrogenase lowers leaf respiration and alters photorespiration and plant growth in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 154(3), 1143-1157.
- Torres, M.A., Dangl, J.L., and Jones, J.D. (2002) Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen

- intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*, 99(1), 517-522.
- Wan, X.Y., and Liu, J.Y. (2008) Comparative proteomics analysis reveals an intimate protein network provoked by hydrogen peroxide stress in rice seedling leaves. *Molecular and Cell Proteomics*, 7(8), 1469-1488.
- Yan, S.P., Zhang, Q.Y., Tang, Z.C., Su, W.A., and Sun, W.N. (2006) Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Molecular and Cell Proteomics*, 5(3), 484-496.
- Zhang, J.S., Li, C.J., Wei, J., and Kirkham, M.B. (1995) Protoplasmic factors, antioxidants responses, and chilling resistance in maize. *Plant Physiology and Biochemistry*, 382, 1123–1131.

TABLES

Table 1. Differentially expressed proteins in non-transformed and APx1/2s-knockdown plants identified by mass spectrometry^b.

^b(a) Functional classification; (b) Protein identification; (c) NCBI accession number; (d) Relative protein fold-change in Apx1/2s leaves compared to NT; (e) Standard deviation; (f) Theoretical isoelectric point; (g) Theoretical molecular mass (KDa); (h) Observed isoelectric point; (i) Observed molecular mass (KDa); (j) Number of peptides matched; (l) Protein score; and (m) Sequence coverage.

| Functional ^a classification | Protein id ^b | Ac. number ^c | Fold change ^d | S.D. ^e | pI _(the) ^f | MM _(the) ^g | pI _(obs) ^h | MM _(obs) ⁱ | P.M. ^j | Score ^l | S.C. ^m (%) |
|---|---|-------------------------|-----------------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------------|
| Photosynthetic process | RuBisCO activase small isoform precursor | BAA97584 | 0.56 | ± 0.24 | 5.80 | 48.0 | 5.25 | 44.5 | 55(22) | 1143 | 50% |
| | Ribulose biphosphate /carboxylase small chain | AAA84592 | 1.38 | ± 0.29 | 8.00 | 12.0 | 7.00 | 15.0 | 8(5) | 238 | 46% |
| | Putative 33kDa oxygen evolving protein of photosystem II | NP_001043134 | 1.30 | ± 0.19 | 6.10 | 35.0 | 5.16 | 36.5 | 84(34) | 1256 | 60% |
| | 23 kDa polypeptide of photosystem II | BAA08564 | 0.66 | ± 0.17 | 9.00 | 27.0 | 5.60 | 24.0 | 5(2) | 93 | 21% |
| | Photosystem II 10 kDa polypeptide | AAB46718 | 2.34 | ± 0.33 | 9.00 | 12.0 | 6.01 | 12.7 | 7(2) | 120 | 22% |
| | Probable photosystem II oxygen-evolving complex protein 2 | NP_001058863 | 1.35 | ± 0.14 | 8.00 | 27.0 | 5.80 | 28.0 | 33(16) | 734 | 42% |
| | Photosystem I subunit VII | NP_001056530 | 1.43 | ± 0.32 | 5.60 | 15.5 | 4.20 | 13.0 | 42(11) | 487 | 46% |
| | Plastocyanin | NP_039445 | 2.43 | ± 0.53 | 6.50 | 9.4 | 6.60 | 11.7 | 7(3) | 207 | 85% |
| | Ferredoxin-1, chloroplastic | Q0J8M2 | 3.87 | ± 0.51 | 4.40 | 15.2 | 4.00 | 24.0 | 13(4) | 30 | 10% |

| | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|--|--------------|------|--------|------|------|------|------|--------|------|-----|
| | Putative ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase | BAD07827 | 1.88 | ± 0.30 | 8.00 | 41.0 | 5.60 | 40.2 | 18(8) | 433 | 35% |
| | ATPase alpha subunit | NP_039380 | 1.47 | ± 0.30 | 6.00 | 55.6 | 6.00 | 60.0 | 23(12) | 635 | 31% |
| | ATP synthase gamma chain | NP_001059768 | 1.71 | ± 0.38 | 8.60 | 40.0 | 6.20 | 44.0 | 13(5) | 326 | 27% |
| | Phosphoglycerate kinase | EAY98560 | 1.18 | ± 0.12 | 6.80 | 30.5 | 5.07 | 35.0 | 9(6) | 508 | 30% |
| | Triosephosphate isomerase, cytosolic | NP_001042016 | 1.45 | ± 0.24 | 5.40 | 27.0 | 5.46 | 30.5 | 46(23) | 953 | 46% |
| | Putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B | NP_001048847 | 0.54 | ± 0.24 | 6.20 | 47.5 | 5.84 | 47.5 | 25(7) | 410 | 82% |
| Response to oxidative stress | | | | | | | | | | | |
| | Glutathione S transferase | NP_001065137 | 2.77 | ± 0.33 | 5.30 | 24.8 | 4.50 | 30.0 | 6(3) | 190 | 27% |
| | L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic | NP_001049769 | 0.47 | ± 0.33 | 5.40 | 27.5 | 5.50 | 30.0 | 20(7) | 549 | 63% |
| | Putative L-ascorbate peroxidase 2, cytosolic | BAA08264 | 0.33 | ± 0.28 | 5.10 | 30.0 | 5.10 | 30.0 | 4(0) | 55 | 26% |
| | Putative superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic precursor | BAD09607 | 4.84 | ± 0.35 | 5.80 | 20.0 | 5.30 | 24.0 | 9(2) | 134 | 23% |
| Phosphate metabolism | | | | | | | | | | | |
| | Putative inorganic pyrophosphatase | BAD16934 | 0.65 | ± 0.17 | 5.80 | 31.0 | 4.90 | 36.5 | 35(10) | 668 | 46% |
| Carbohydrate metabolic process | | | | | | | | | | | |
| | Malate dehydrogenase, cytoplasmic, putative, expressed | ABG66141 | 1.40 | ± 0.34 | 5.84 | 36.0 | 5.80 | 43.5 | 34(6) | 502 | 41% |
| Protein metabolic process | | | | | | | | | | | |
| | Putative precursor glutamine synthetase, chloroplastic | AAL87183 | 1.20 | ± 0.12 | 6.20 | 49.7 | 5.20 | 48.5 | 54(24) | 918 | 48% |
| Assistant proteins | | | | | | | | | | | |
| | Belongs to the heat shock | EEE63158 | 0.50 | ± | 5.10 | 74.0 | 4.70 | 81.2 | 58(23) | 1354 | 43% |

| | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|---|--------|--------------|------|-----------|------|------|------|------|--------|-----|-----|--|
| | protein 70 family. | | | | 0.35 | | | | | | | | |
| | Putative chaperonin 60 beta – HSP 60 family | | NP_001056601 | 1.23 | ± 0.15 | 5.60 | 64.0 | 5.10 | 66.5 | 23(7) | 588 | 37% | |
| RNA degradation | | | | | | | | | | | | | |
| | Drought-induced ribonuclease | S-like | AAL33776 | 3.68 | ± 0.26 | 5.00 | 30.0 | 4.90 | 30.2 | 33(10) | 603 | 48% | |
| Translation regulator activity | | | | | | | | | | | | | |
| | Elongation factor Tu | | EEC73516 | 1.83 | ± 0.37 | 6.20 | 50.0 | 5.50 | 50.7 | 40(15) | 879 | 53% | |

Table 2. Photosynthetic and photochemical parameters^a.

^aRubisco carboxylation maximum rate (V_{cmax}), maximum electron flux (J_{max}), mesophyll conductance (g_m) and stomatal conductance (g_s), electron transport flux (J), net photosynthesis (P_N), light respiration (R_d) and photorespiration (P_r). V_{cmax} , J_{max} and g_m were obtained from P_N/C_i curves, while the other parameters were measured under $[CO_2]$ at 400 ppm and PPFD at 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

| Photosynthetic parameters (gas exchange) | | | | | | | |
|---|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | V_{cmax} | J_{max} | g_m | g_s | P_N | R_d | P_r |
| NT | 174 | 175 | 6.09 | 0.45 | 19.70 | 7.34 | 0.368 |
| APx1/2s | 180 | 168 | 6.56 | 0.41 | 21.02 | 7.02 | 0.820 |
| Photochemical parameters | | | | | | | |
| | F_v/F_m | $\Delta F/F_m'$ | qP | J | NPQ | | |
| NT | 0.727 | 0.651 | 0.936 | 112.6 | 0.079 | | |
| APx1/2s | 0.730 | 0.643 | 0.935 | 122.0 | 0.119 | | |

FIGURES

Figure 1. Molecular functional classification of the differentially expressed genes identified in the microarray analysis. (A) Up-regulated genes; (B) Down-regulated genes. The predicted molecular functions were collected at the Rice Genome Annotation (<http://rice.plantbiology.msu.edu>).

Figure 2. Validation of differentially expressed genes in the microarray experiment by quantitative real-time PCR. This figure shows graphs of fifteen genes selected for validation. (2A) Calcium-dependent protein kinase [TIGR:LOC_Os01g10890]; (2B) Carboxylesterase [TIGR:LOC_Os07g34280]; (2C) 6-phosphogluconate dehydrogenase [TIGR:LOC_Os06g02144]; (2D) Basic Helix-Loop-Helix motif [TIGR:LOC_Os01g06640]; (2E) GRAS-family transcription factor [TIGR:LOC_Os04g50060]; (2F) Terpene synthase [TIGR:LOC_Os03g24760]; (2G) Heat shock protein [TIGR:LOC_Os09g30412]; (2H) RNA recognition motif [TIGR:LOC_Os03g18720]; (2I) Cytochrome b-c1 complex [TIGR:LOC_Os04g32660]; (2J) ATP-dependent Clp protease [TIGR:LOC_Os08g15270]; (2K) No apical meristem protein [TIGR:LOC_Os01g01430]; (2L) Asparagine synthetase [TIGR:LOC_Os03g18130]; (2M) Expressed protein [TIGR:LOC_Os04g02490]; (2N) Expressed protein [TIGR:LOC_Os03g02470]; and (2O) Expressed protein [TIGR:LOC_Os07g32710]. RT-qPCR experiments were performed with leaves from NT and APx1/2s knockdown plants using two endogenous reference genes. The means indicated by different letters are statistically different based on the results of Student's t-test ($P \leq 0.05$).

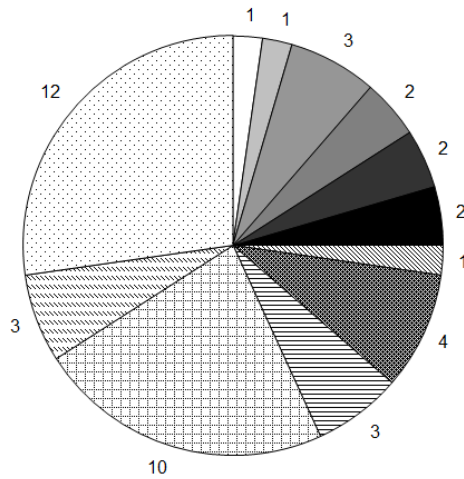
Figure 3. Functional classification and distribution of 24 proteins with altered expression in APx1/2s plants after mass spectrometry analysis.

Figure 4. Expression of the genes related to ROS. Relative expression levels were analyzed by quantitative real time PCR using leaves from NT and knockdown plants. The graphs shows the expression of (A) IMMUTANS [TIGR:LOC_Os04g57320]; (B) NADPHoxi (RbohD) [TIGR:LOC_Os11g33120]; (C) Monodehydroascorbate Reductase 1 [TIGR:LOC_Os09g39380; (D) Monodehydroascorbate Reductase 2 [TIGR:LOC_Os08g44340]; (E) Monodehydroascorbate Reductase 3 [TIGR:LOC_Os02g47800]; and (F) Monodehydroascorbate Reductase 5 [TIGR:LOC_Os08g05570].

Figure 1

A

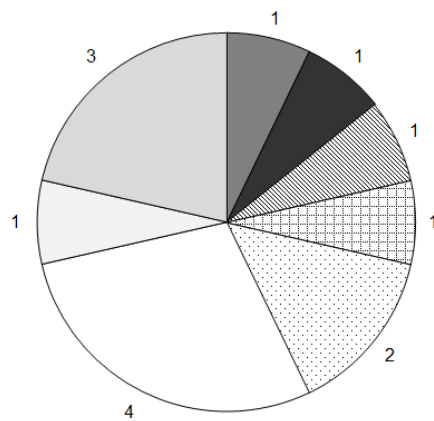
Microarray up-regulated genes



- Transporter activity
- Translation regulator activity
- ▣ Photosynthetic process
- ▣ Protein metabolic process
- Metabolic and energetic process
- RNA degradation
- ▣ Carbohydrate metabolic process
- ▣ Transcription factor
- ▣ Response to oxidative stress
- ▣ Catalytic activity
- Others
- Function not assigned

B

Microarray down-regulated genes



- ▣ Photosynthetic process
- Protein metabolic process
- ▣ Metabolic and energetic process
- ▣ Carbohydrate metabolic process
- Response to oxidative stress
- Catalytic activity
- Others
- Function not assigned

Figure 2

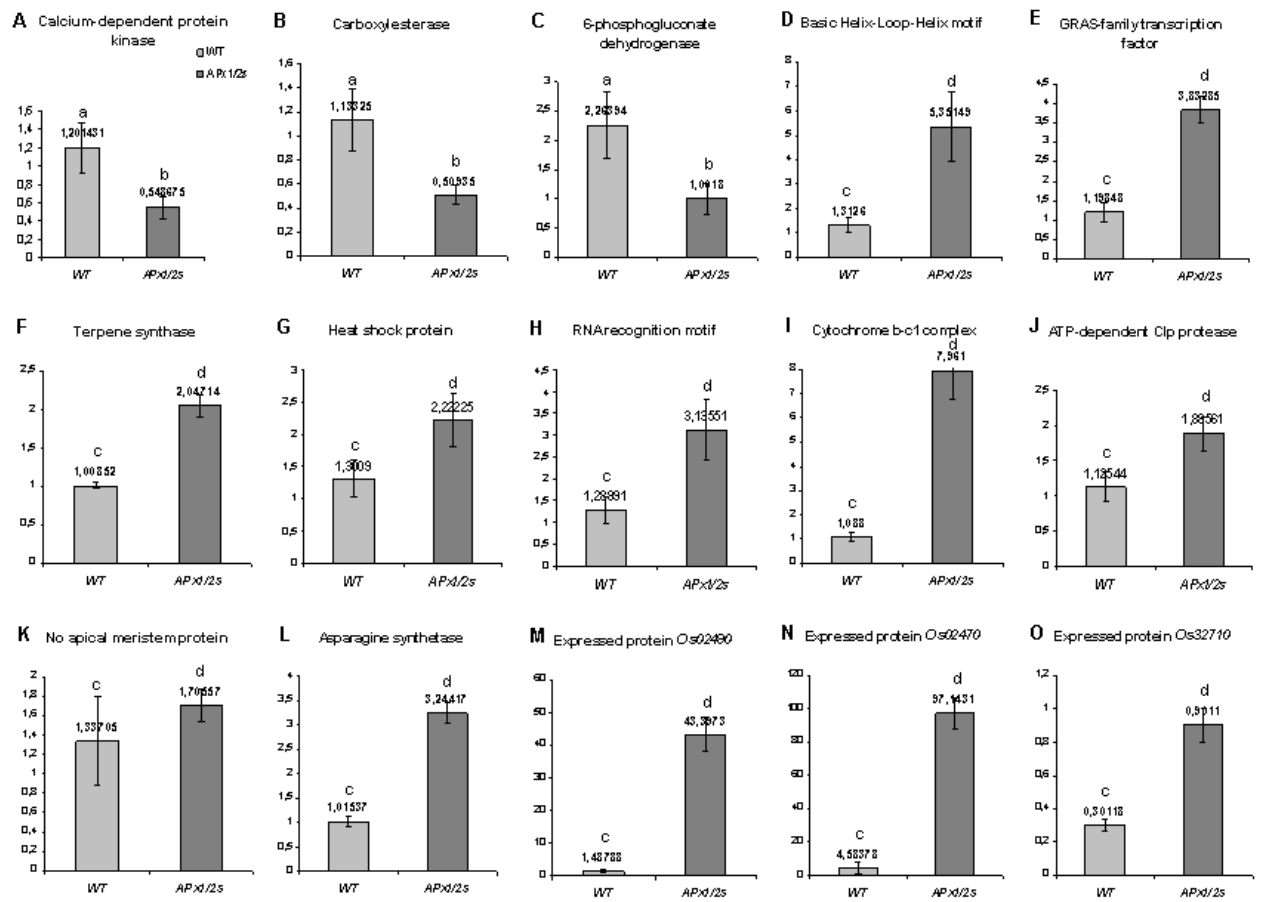


Figure 3

Proteomic

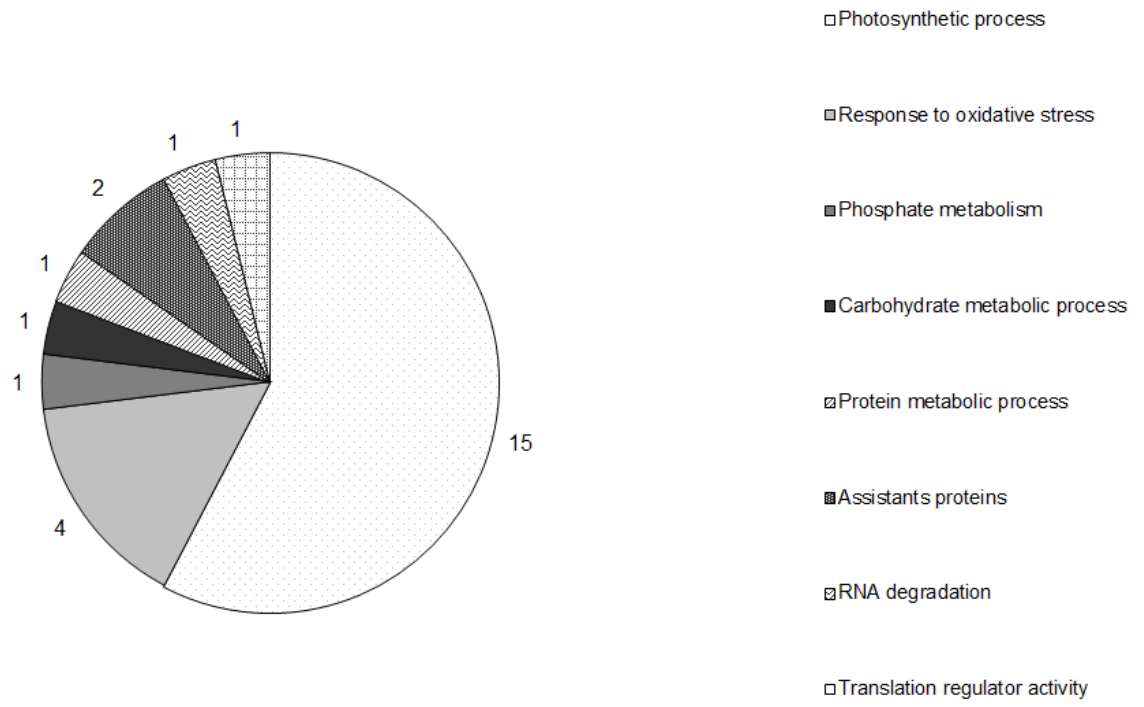
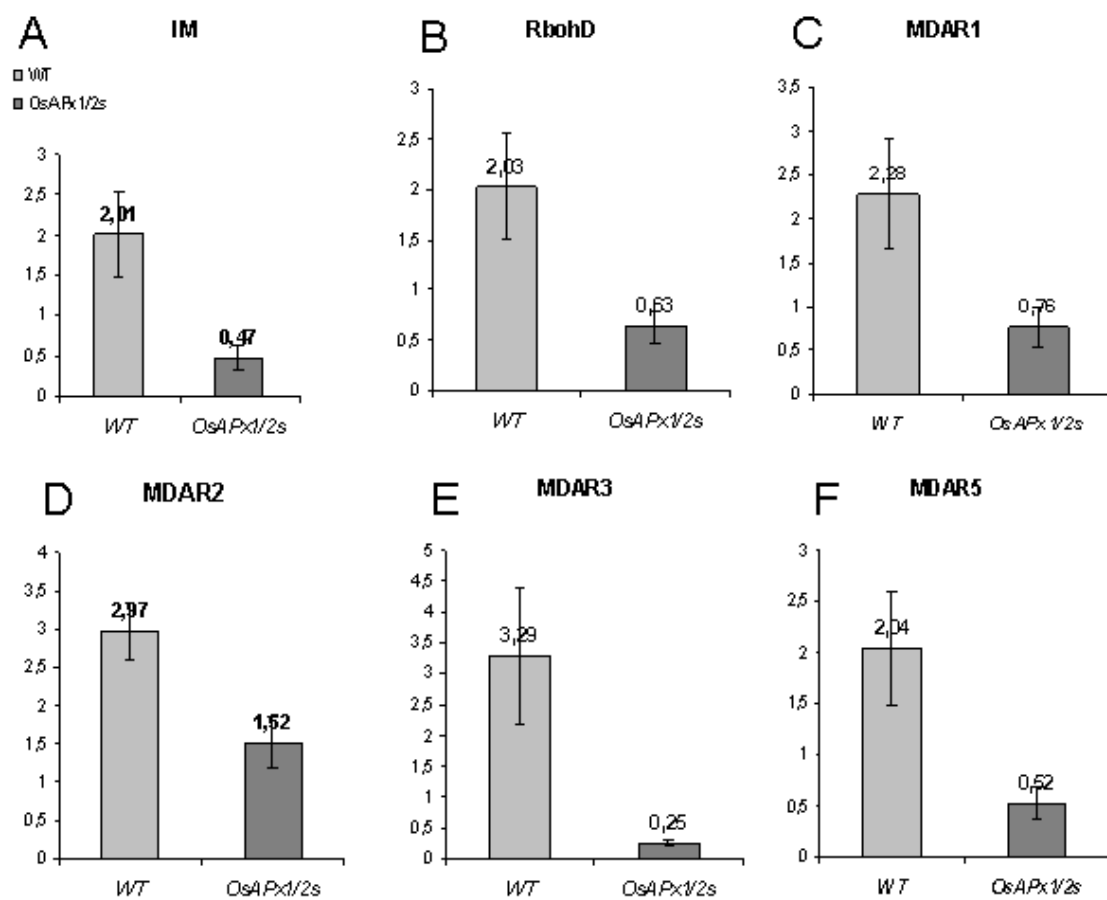


Figure 4



Supplementary Material

Figure S1. Response of OsAPx1/2s and NT plants to UV light.

In situ localization of H₂O₂ in leaves of silenced and NT plants (20-day-old) exposed to UV irradiation (two exposures of 15 minutes to UVC with a 15 min interval). Analyses were performed immediately (t₀) and 30 min (t₃₀) after the end of the stress period. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) staining was used to localize H₂O₂ accumulation. Rice leaves were incubated with 0.1% (w/v) DAB (Sigma) in 10 mM MES (Sigma), pH 5.8, for 12 h. Leaves were cleared by boiling in 96% ethanol for 10 minutes before photography. The photograph was taken after DAB reaction. Leaves of OsAPx1/2s plants accumulated higher H₂O₂ content than leaves of NT plants under germicidal UV stress.

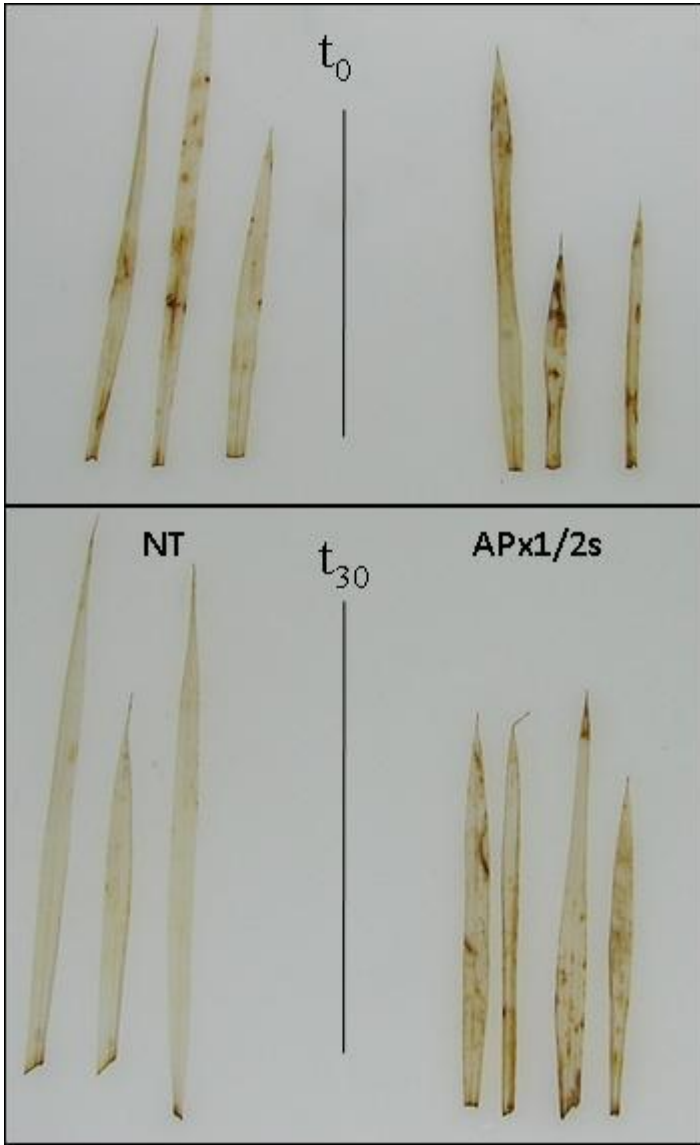


Table S1. List of primers used in RT-qPCR analysis.

| Gene id (TIGR) | Annotation | Primers |
|-----------------------|---|--|
| LOC_Os03g18130 | Asparagine synthetase | ATGAAGAACGCTGCCAAAGT ACTGCTCCACCCACTCGAT |
| LOC_Os08g04500 | Terpene synthase 7 | AAGAGCGCGGTCTCTATTCT GGGCCTCACGGAGGTAGTAT |
| LOC_Os03g18720 | RNA recognition | AAAACGACGAGCTGAAGAGG GCATCATGCTTGTAGTCTCAGC |
| LOC_Os06g02144 | 6-phosphogluconate dehydrogenase | GCATCAAGAAGGCCTACGAC GGAGTCGAAGTACGCGAGAC |
| LOC_Os01g01430 | No apical meristem protein | TCCTCTTCCATATACTCCATCCA TCGTTCGTCCATCATCATGTC |
| LOC_Os01g06640 | Basic helix-loop-helix motif | AGGATCAATGCTCATCTGACAA GCATTCGATGGAGACTTCGT |
| LOC_Os04g50060 | GRAS family transcription factor | GACGAAAACAGGCTGCTGAT CTTGCTTCTTCACCGTCTC |
| LOC_Os09g30412 | Heat shock protein | CGTGATACCTCTGGTGAGCA TCGGTTGTCTTCTCAGTCCA |
| LOC_Os08g15270 | ATP-dependent Clp protease | ACGCGAGGATTATGCTTCAC TCGGATACAACCCAAAAGG |
| LOC_Os04g32660 | Cytochrome b-c1 complex | CCTGGAGGTGGATCTCTCAA GCCAATGACCACTAGCCACT |
| LOC_Os01g10890 | CAMK_KIN1/SNF1/Nim1 calcium/calmodulin dependent protein kinase | AGGGGTACAAACCAGCAGTG ACTGGCTTCAAAGAGCTTGC |
| LOC_Os07g34280 | CXE carboxylesterase | GTGGTCGTCGACGTACAGTG GGGACCAATGCTTAATGACG |
| LOC_Os04g02490 | Expressed Protein | ACACCATGACCCACCCTCT ATCCTGCGAAACAAGATTGC |
| LOC_Os03g02470 | Expressed Protein | GCCCAGATCGTCGTCATATT TGCTGCTGCTTGGATAATTG |
| LOC_Os07g32710 | Expressed Protein | GGTGGAGGTTTTCGGTGGT GAGTCCGCCACCTAGTCCA |
| LOC_Os03g17690 | Ascorbate peroxidase 1 | CTACAAGGAGGCCACCTCA CCGCATTTCATACCAACACA |
| LOC_Os07g49400 | Ascorbate peroxidase 2 | ACCTGAGGTCCCCTTCCA CTCTCCTTGTGGCATCTTCC |
| LOC_Os02g57040 | Formaldehyde dehydrogenase | CAAAATCAGCTGGTGCTTCTC TTCCAATGCATTCAAAGCTG |
| LOC_Os03g08020 | Elongation factor | TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA |
| LOC_Os04g57320 | IMMUTANS | CAAACAGCAAGAGTCCCATGT CTGCATAGAGTGAGGAGAACGA |
| LOC_Os11g33120 | NADPH oxidase (RbohD) | ACTGGCGCAACGTCTACAAG TGTGGAAGTCGAATTTTCGTG |
| LOC_Os09g39380 | Monodehydroascorbate reductase 1 | TCTGCAGAGCAGGCTGTAAA ACTGTCTCCGAACAGGATGG |
| LOC_Os08g44340 | Monodehydroascorbate reductase 2 | GCCTTCCCGATGAAGCTAT GACGTTGTCGCCGTAGAACT |

| | | |
|----------------|----------------------------------|---|
| LOC_Os02g47800 | Monodehydroascorbate reductase 3 | GGCCCGTCTATTTACACCAA ACAACCATATCGGCAGGAAG |
| LOC_Os08g05570 | Monodehydroascorbate reductase 5 | TCGACTGAAGGGTGTTTTCC GGAGAGAGCTTCTTGCGATCT |
| LOC_Os04g46960 | Glutathione peroxidase 1 | AGCAACCTGCACTTATGCACT CAGCAAGGAAATTTATTGACATGA |
| LOC_Os03g24380 | Glutathione peroxidase 2 | CTGGTTGGGTAGGCACTGTT TGCAAACACAAACCTTACGCTAC |
| LOC_Os06g08670 | Glutathione peroxidase 4 | CTGTACATATGCCTTGCCTCA GTTACAGGGGCCAGATAAGC |
| LOC_Os02g02400 | Catalase A | AGGAGTACTGGAGGGTCTTCG ACTTGACGTACCTGGCCTTG |
| LOC_Os06g51150 | Catalase B | TCAAGCCAAGTCCAAAGACC AGGTGAGGCTTCCATCCTT |

Table S2. Global gene expression modulation in response of cytosolic *OsAPx* isoform silencing^a.

^aFunctional classification, gene identification (TIGR6.1), annotation, log-fold change (Log-FC) and false-discovery rate adjusted p-value (Adj.P.Val) for up or down-regulated genes in APx1/2s knockdown plants are shown. Locus identification numbers are given in the second column from the left. Gene annotation, up- or down-regulation in response to hydrogen peroxide accumulation and adjusted p-values are given in the third, fourth, fifth and sixth columns from the left, respectively. Transcriptome profiling and data analysis were performed as described in ‘‘Materials and Methods’’. The gene modulations are given by log₂ fold-change in gene expression compared with NT plants.

| Functional classification | Gene id (TIGR) | Annotation | Log-FC | | Adj.P.Val |
|---------------------------------|----------------|---------------------------------|--------|-------|----------------------|
| | | | Up | Down | |
| Transporter activity | LOC_Os10g14870 | Heavy metal-associated domain | 1.25 | | 5.4142361643186e-07 |
| Translation regulator activity | LOC_Os03g08010 | Elongation factor Tu | 1.34 | | 3.22140665763716e-09 |
| Photosynthetic process | LOC_Os01g45274 | Carbonic anhydrase | 1.07 | | 1.41196265462816e-07 |
| | LOC_Os02g24630 | Photosystem II D2 protein | 1.41 | | 1.21238932351087e-06 |
| | LOC_Os11g07020 | Fructose-bisphosphate aldolase | 1.76 | | 6.78780249928681e-12 |
| | LOC_Os03g03720 | Glyceraldehyde 3-phosphate | | -1.34 | 0.0401937902315108 |
| Protein metabolic process | LOC_Os03g18130 | Asparagine synthetase | 0.82 | | 0.1930764389058862 |
| | LOC_Os01g51410 | Glycine dehydrogenase | 1.09 | | 2.09572832521268e-05 |
| | LOC_Os10g28350 | Methylthiopentene dioxygenase 1 | | -1.04 | 0.000118940389229357 |
| Metabolic and energetic process | LOC_Os03g24760 | Terpene synthase | 1.00 | | 1.12930272354902e-06 |
| | LOC_Os12g14440 | Jacalin-like lectin domain | 1.03 | | 4.20672754545827e-06 |
| | LOC_Os08g04500 | Terpene synthase | | -1.00 | 0.000128947830283902 |
| RNA degradation | LOC_Os03g18720 | RNA recognition | 1.04 | | 0.000119777160004920 |
| | LOC_Os04g45070 | Remorin | 1.27 | | 1.21238932351087e-06 |

| | | | | |
|--------------------------------|----------------|---|-------|----------------------|
| Carbohydrate metabolic process | LOC_Os06g02144 | 6-phosphogluconate dehydrogenase | 1.15 | 3.40750563909946e-05 |
| | LOC_Os10g21590 | Carbohydrate transporter | -1.48 | 8.36104626091157e-08 |
| Transcription factor | LOC_Os03g57900 | Zn Finger A20/AN1 | 0.97 | 0.365400855745607 |
| | LOC_Os01g01430 | No apical meristem protein | 1.57 | 0.361407327697607 |
| | LOC_Os01g06640 | Basic helix-loop-helix motif | 0.90 | 0.393198828736862 |
| | LOC_Os04g50060 | GRAS family transcription factor | 1.17 | 0.123536582633125 |
| Response to oxidative stress | LOC_Os07g44440 | Peroxiredoxin | 3.07 | 0.0550208264453948 |
| | LOC_Os05g05940 | Stress-related protein | 1.19 | 1.21238932351087e-06 |
| | LOC_Os04g59150 | Peroxidase precursor | 1.19 | 2.11116541081612e-05 |
| | LOC_Os03g17690 | Ascorbate peroxidase 1 | -2.22 | 0.0255210637342291 |
| | LOC_Os07g49400 | Ascorbate peroxidase 2 | -0.68 | 0.661335545999237 |
| Catalytic activity | LOC_Os09g36040 | Rhodanese-like domain | 1.03 | 3.12795512660743e-07 |
| | LOC_Os09g30412 | Heat shock protein | 1.01 | 4.09648728836484e-07 |
| | LOC_Os12g23180 | 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase | 1.11 | 5.89224512603941e-05 |
| | LOC_Os01g17170 | Magnesium-protoporphyrin IX | 1.10 | 7.3570877226963e-08 |
| | LOC_Os08g15270 | ATP-dependent Clp protease | 1.11 | 2.69802141951405e-05 |
| | LOC_Os01g49670 | Cytidylyltransferase domain | 1.07 | 8.69214029116063e-05 |
| | LOC_Os01g51870 | Methyltransferase | 0.93 | 0.345066439287404 |
| | LOC_Os07g13770 | UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase | 0.95 | 0.289047569901284 |
| | LOC_Os04g32660 | Cytochrome b-c1 complex | 2.09 | 0.0687351962570547 |
| | LOC_Os11g47970 | AAA-type ATPase family protein | 1.26 | 3.84430673607677e-08 |
| | LOC_Os01g10890 | CAMK_KIN1/SNF1/Nim1 calcium/calmodulin dependent protein kinase | -1.04 | 0.03853828904551 |
| | LOC_Os07g34280 | CXE carboxylesterase | -0.88 | 0.02165456909214 |
| | LOC_Os02g40784 | WAX2 | -0.73 | 0.042889321453412 |
| | LOC_Os07g04990 | Oxidoreductase | -1.33 | 0.036742680032653 |
| Others | LOC_Os03g26010 | Retrotransposon | 0.99 | 0.275010114080337 |
| | LOC_Os07g44410 | WD40 | 2.42 | 0.0197420433742603 |
| | LOC_Os12g12360 | Transposon | 1.23 | 1.38794096567605e-05 |
| | LOC_Os03g58470 | Retrotransposon | -1.64 | 0.0197420433742603 |
| Function not assigned | LOC_Os08g05960 | Expressed Protein | 1.00 | 1.28903465821326e-05 |
| | LOC_Os01g38650 | Expressed Protein | 1.47 | 0.633634941960963 |
| | LOC_Os04g27100 | Expressed Protein | 1.60 | 0.16822349047581 |
| | LOC_Os01g58140 | Expressed Protein | 1.70 | 0.21689388740217 |

| | | | | |
|----------------|-------------------|------|-------|----------------------|
| LOC_Os04g02490 | Expressed Protein | 2.18 | | 0.147955766021768 |
| LOC_Os03g55460 | Expressed Protein | 2.31 | | 0.13903759841395 |
| LOC_Os03g43100 | Expressed Protein | 2.66 | | 0.281532054783278 |
| LOC_Os03g02470 | Expressed Protein | 3.83 | | 0.14904377894229 |
| LOC_Os07g32710 | Expressed Protein | 5.15 | | 0.00164570244178666 |
| LOC_Os05g36240 | Expressed Protein | 2.41 | | 0.00164570244178666 |
| LOC_Os08g02210 | Expressed Protein | 1.13 | | 4.50110501598106e-05 |
| LOC_Os06g47970 | Expressed Protein | 1.36 | | 2.6686872898994e-06 |
| LOC_Os04g31790 | Expressed Protein | | -0.95 | 0.12129884502487 |
| LOC_Os06g15430 | Expressed Protein | | -2.82 | 3.92385543418862e-12 |
| LOC_Os05g01330 | Expressed Protein | | -1.65 | 2.28665668371733e-10 |

CAPÍTULO 2

ISOFORMAS PEROXISSOMAS DE ASCORBATO PEROXIDASE DE ARROZ (APx3 e APx4)

Neste capítulo são apresentados os resultados referentes aos estudos de caracterização das isoformas peroxissomais de ascorbato peroxidase (APx3 e APx4). Para estas isoformas foi realizada a caracterização molecular e fenotípica das plantas silenciadas, e, também, a análise de expressão destes genes através do estudo de promotores e hibridização *in situ*. As plantas transformadas com o vetor para silenciamento do gene *OsAPx3* foram denominadas de plantas APx3s e as plantas transformadas com o vetor para silenciamento do gene *OsAPx4* foram denominadas de APx4s.

1. Introdução

As enzimas ascorbato peroxidases são encontradas em diversos compartimentos subcelulares. Em arroz, duas isoformas estão localizadas no peroxissomo, correspondendo às isoformas APx3 e APx4 (Teixeira et al., 2004).

Peroxisomo é uma organela intracelular, delimitada por uma membrana constituída por uma bicamada lipídica e que possui diferentes formas e funções (Lazarow e Fujiki, 1985). Os peroxissomos de plantas são separados em diferentes classes de acordo com o conteúdo enzimático, o que depende do tipo de célula ou tecido ou estágio de crescimento e desenvolvimento em que a planta se encontra (Olsen, 1998; Mano e Nishimura, 2005). Estas organelas podem ser classificadas em glioxissomos, peroxissomos de folhas, gerontossomos, peroxissomos de nódulos de raízes e peroxissomos não-especializados (Mullen e Trelease, 2006). A principal característica dos peroxissomos é a presença de enzimas diretamente relacionadas com o peróxido de hidrogênio, como catalases e outras oxidases, sendo a ascorbato peroxidase uma das enzimas presentes nesta organela.

As APxs peroxissomais encontram-se ancoradas na membrana e têm papel chave na proteção das células vegetais (Bunkelmann e Trelease, 1996). Em combinação com outras enzimas, participam da redução do peróxido de hidrogênio e da ciclagem de

elétrons através do ascorbato molecular, assim como da produção de NAD⁺ que será utilizado em diversos processos metabólicos dentro do peroxissomo (Jimenez et al., 1998). Por seu papel na remoção de ERO na membrana do peroxissomo, as APx são consideradas componentes importantes da cascata de sinalização que é iniciada em resposta a estresses oxidativos externos (Shigeoka et al., 2002; Yan et al., 2003; Nyathi e Baker, 2006).

Estresses abióticos inibem o crescimento e desenvolvimento das plantas, além de afetarem uma grande quantidade de processos metabólicos celulares (Zhu, 2001). Sob condições de estresse, ocorre o acúmulo de ERO nas células e, assim, vários processos do desenvolvimento das plantas podem ser alterados, como a floração (Li et al., 2006) e a senescência (Guo e Gan, 2004). A senescência constitui a parte final do desenvolvimento foliar e é fundamental para o ‘*fitness*’ da planta. Avanços já foram feitos na caracterização molecular dos fatores que regulam a senescência, revelando uma complexa rede molecular regulatória, composta por fatores de transcrição, reguladores de metabolismo e receptores e sinalizadores para hormônios e para resposta a estresse (Lim et al., 2007).

Este capítulo apresenta os resultados obtidos da caracterização e análise de expressão dos genes peroxissomais *OsAPx3* e *OsAPx4* por RT-qPCR, assim como estudo das regiões promotoras destes genes e análises de hibridização *in situ* em tecidos de panícula. Plantas de arroz silenciadas para estes genes demonstraram um atraso no desenvolvimento da panícula e maior suscetibilidade ao processo de senescência em relação às plantas não-transformadas.

2. Resultados

2.1. Plantas silenciadas APx3s, APx4s e APx3/4s

As plantas que regeneraram e cresceram no meio de seleção contendo o antibiótico higromicina foram consideradas transformadas. Após a transformação com *Agrobacterium*, o DNA de interesse introduzido pode estar integrado ao genoma das plantas ou não. Considerando inúmeras divisões celulares, a permanência do agente marcador de seleção caracteriza um elemento de transformação positiva. Caso contrário,

o tecido submetido ao processo de transformação genética, ao passar pelo processo de seleção por antibiótico, não é viável, vindo a perecer no processo de multiplicação.

Após a transformação, plantas de arroz regeneradas foram transferidas para solo e cultivadas em casa de vegetação. Dentre os calos transformados, foram obtidos 20 eventos transformados, entretanto, apenas seis eventos regeneraram produzindo seis linhagens de plantas adultas.

Para confirmação da integração do cassete de silenciamento no genoma das plantas transformadas, foram extraídos os DNAs genômicos das plantas transformadas e não-transformadas para posterior análise por PCR, utilizando os *primers* específicos para amplificação dos genes *hpt* e *gus*, presentes no vetor. As plantas com amplificação positiva para estes genes foram consideradas transformadas. Plantas não-transformadas foram utilizadas como controle e não apresentaram banda de amplificação.

Após seleção das plantas transformadas e confirmação da integração do cassete de silenciamento sob controle do promotor da ubiquitina do milho no genoma, as plantas que apresentaram um produto de amplificação esperado foram selecionadas para análise de expressão gênica. Esta análise visa confirmar o nível de expressão dos genes de APx, para verificar se o silenciamento foi efetivo.

A análise foi realizada através da obtenção de transcritos das plantas transformadas e não-transformadas e análise por RT-qPCR. Através da quantificação relativa dos transcritos por RT-qPCR foi possível a confirmação do silenciamento do gene *OsAPx4* nas plantas transformadas, utilizando pares de *primers* específicos (apêndice B). A Figura 10 apresenta o resultado do RT-qPCR realizado com as plantas transformadas e não-transformadas (NT), confirmando o silenciamento da isoforma peroxissomal APx4, com silenciamento aproximado de 99%.

Expressão relativa de *OsAPx4* nas plantas APx4s e NT

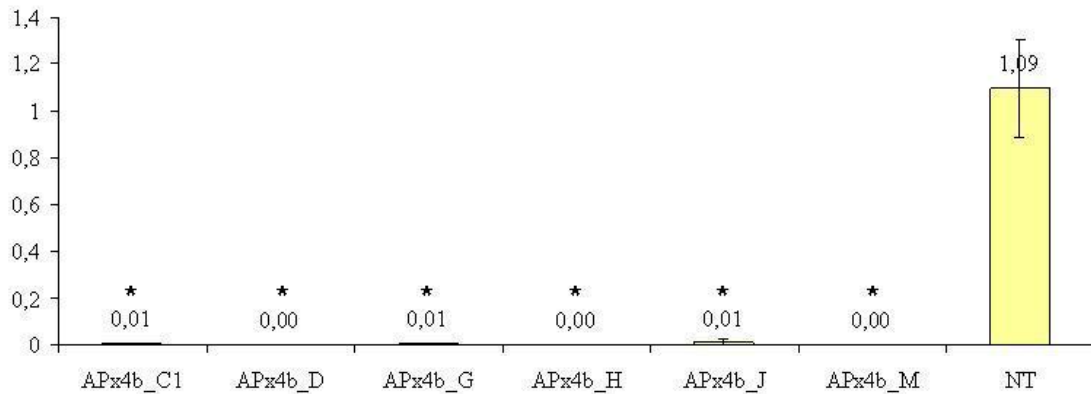


Figura 10. Expressão relativa do gene *OsAPx4* em plantas NT e plantas de diferentes linhagens silenciadas APx4s por RT-qPCR. Os gráficos representam a expressão do gene *OsAPx4* relativo à expressão dos genes *Fdh* e *eF*. A normalização dos resultados foi feita em relação à expressão relativa da planta NT. Os valores representam a média \pm EP (erro padrão). As barras marcadas com asteriscos representam médias estatisticamente diferentes entre as plantas silenciadas APx4s e NT, baseados nos resultados do Teste *t* ($P < 0,05$).

2.2. Caracterização fenotípica

Plantas transformadas, aclimatadas em casa de vegetação, tiveram seu crescimento e desenvolvimento analisados. A Figura 11 apresenta plantas APx3s, APx4s e APx3/4s, obtidas previamente por Rosa (2008).

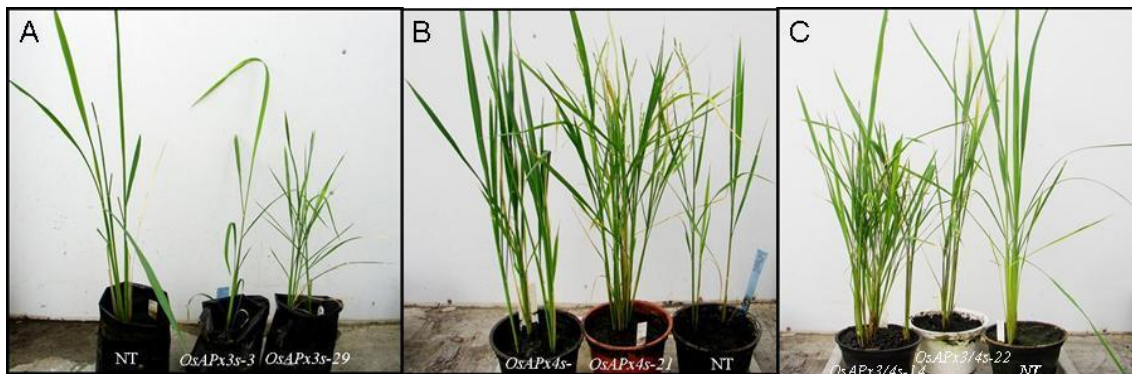


Figura 11. Plantas NT e transformadas com as construções pRNAi para as APxs peroxissomais. (A) plantas APx3s; (B) plantas APx4s; e (C) plantas APx3/4s. Estas plantas foram previamente obtidas pela MSc. Sílvia Rosa em sua dissertação de mestrado em 2008.

As plantas transformadas e silenciadas apresentaram alterações fenotípicas quase imperceptíveis quando comparadas às plantas não-transformadas. Características como crescimento e desenvolvimento foram considerados normais, semelhantes à planta controle. Entretanto, as plantas transformadas apresentaram alterações no desenvolvimento das panículas e maior suscetibilidade à senescência.

Plantas APx4s de diferentes linhagens foram analisadas ao longo do desenvolvimento da panícula e foi verificado que estas plantas apresentaram atraso no desenvolvimento, estando um estágio de desenvolvimento da panícula anterior em relação à planta não-transformada. A Figura 12 mostra a panícula de uma planta não-transformada e de uma planta APx4s. A planta não-transformada encontra-se no estágio R4 do desenvolvimento reprodutivo, entretanto a planta APx4s encontra-se no estágio R3.

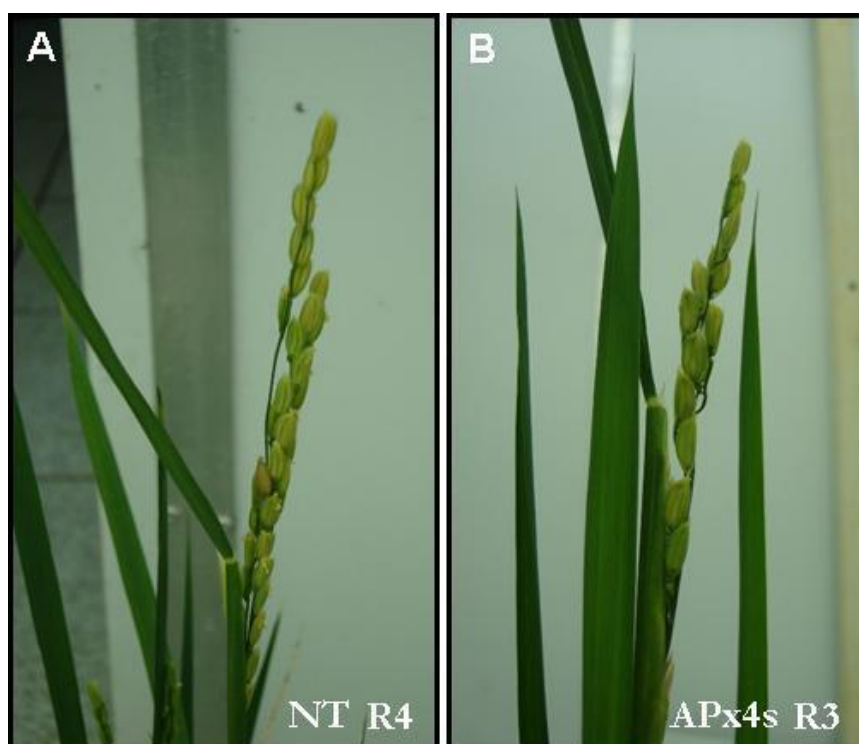


Figura 12. Plantas de arroz NT (A) e APx4s (B) mostrando atraso no desenvolvimento da panícula. A planta NT encontra-se em estágio R4 e a planta APx4s encontra-se em estágio R3. As plantas NT e APx4s foram germinadas de sementes (T1).

Análises das flores de arroz de plantas não-transformadas e plantas APx4s não mostraram diferenças estruturais e na formação dos órgãos internos. A Figura 13 mostra flores de arroz de planta não-transformada (Figura 13A) e de planta APx4s (Figura

13B), com estames e pistilos. Nota-se que os estames e pistilos nas plantas NT estão em processo de degeneração, enquanto nas plantas APx4s estas estruturas ainda estão viáveis. Pode-se inferir que as plantas APx4s apresentam o desenvolvimento reprodutivo levemente atrasado em relação à planta NT.

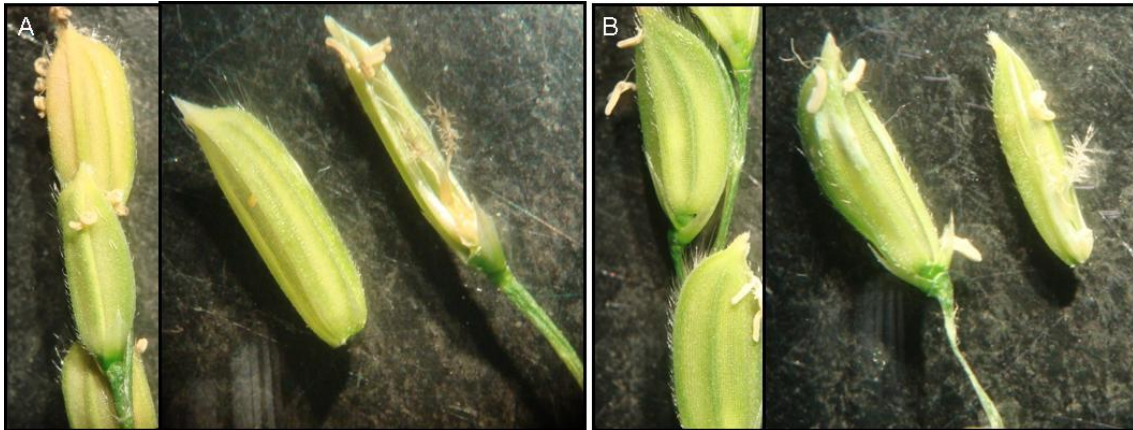


Figura 13. Flores de arroz de plantas não-transformadas (A) e APx4s (B). As estruturas florais presentes não demonstram nenhuma alteração de formato, apenas atraso no desenvolvimento.

Além deste atraso no desenvolvimento da panícula, as plantas APx4s também apresentam menor número de espiguetas por panícula em relação às plantas não-transformadas. A Tabela 1 apresenta o número de panículas e o número de espiguetas por panícula em três plantas não-transformadas e plantas APx4s com seis meses de idade.

Tabela 1. Número de espiguetas de arroz de plantas NT e plantas APx4s aos seis meses

| Idade: seis meses | | | | |
|-----------------------------|----------------|------|-----------------------------|------------------|
| Plantas NT | | | Plantas APx4s | |
| Fase reprodutiva: R6 | | | Fase reprodutiva: R4 | |
| Panícula | Espiguetas | Grão | Panícula | Espiguetas |
| 1 | 22 | 4 | 1 | 12 |
| 2 | 14 | | 2 | 7 |
| 3 | 20 | | 3 | 10 |
| 4 | 9 | | 4 | 17 |
| 5 | 15 | | 5 | 9 |
| 6 | 17 | | 6 | 9 |
| 7 | 13 | | 7 | 17 |
| 8 | 17 | | 8 | 7 |
| 9 | 3 | | 9 | 11 |
| 10 | 18 | | 10 | 25 |
| 11 | 25 | | 11 | 7 |
| 12 | 20 | | | |
| 13 | 22 | 1 | | |
| 14 | 14 | | | |
| 15 | 13 | | | |
| 16 | 15 | | | |
| Média | 16,0625 | | 11,5454 | |
| Teste t | | | | 0,044052* |

* Valor estatisticamente diferente baseado no resultado do Teste *t* ($P < 0,05$).

Em relação à senescência, foi observado que ao longo do desenvolvimento as plantas APx4s apresentavam maior número de folhas secas, senescentes, quando comparadas às plantas não-transformadas. A Figura 14 apresenta seis plantas de diferentes linhagens de APx4s e nota-se que as plantas transformadas apresentam maior número de folhas senescentes em relação à planta não-transformada, com apenas dois meses de idade.

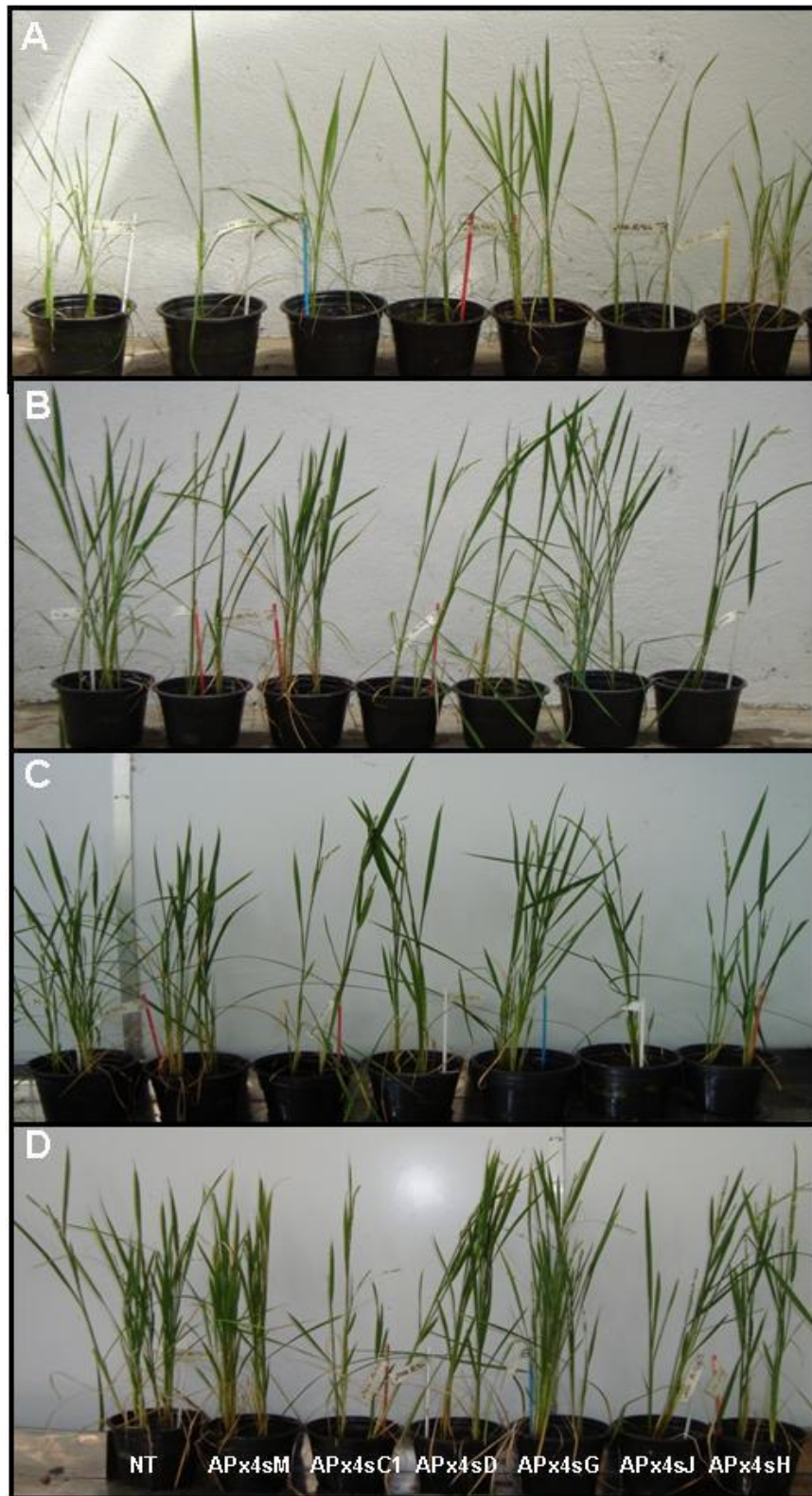


Figura 14. Plantas não-transformadas (NT) e plantas APx4s de diferentes linhagens. As plantas transformadas apresentam um maior número de folhas senescentes em relação às plantas NT, ao longo do desenvolvimento. (A) Plantas de 2 meses; (B) Plantas de 3 meses; (C) Plantas de 4 meses; e (D) Plantas de 5 meses.

Após aproximadamente um ano, as plantas APx4s de uma linhagem obtida previamente, apresentavam quase todas as suas folhas senescentes, com um pequeno número de folhas verdes (Figura 15A). Na Figura 15C observa-se plantas com três anos e nota-se que a planta APx4s apresenta menor número de folhas, e maior quantidade de folhas secas.

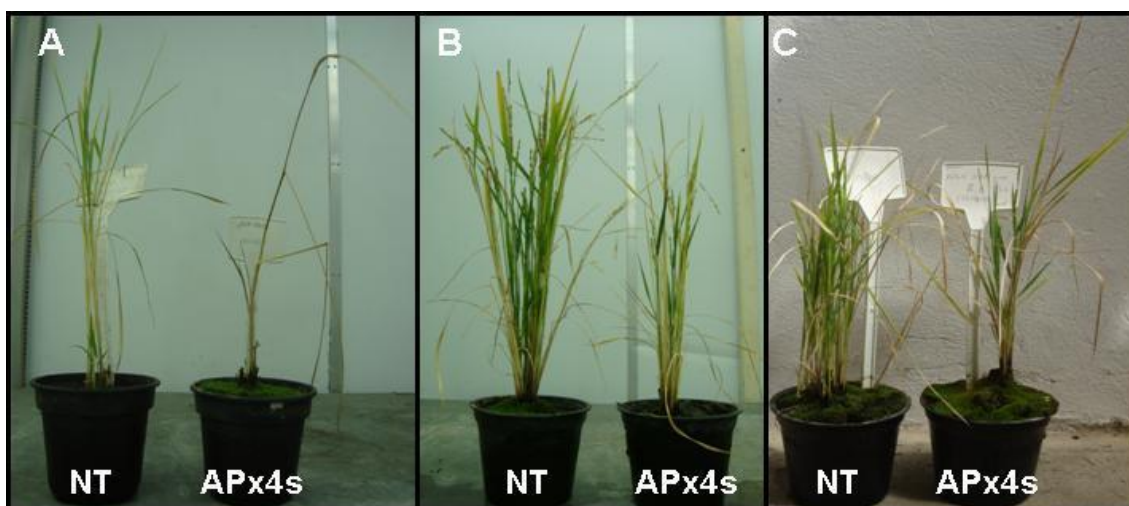


Figura 15. Plantas não-transformadas e plantas APx4s, mostrando a senescência adiantada nas plantas transformadas. (A) Plantas com um ano; (B) Plantas com dois anos; e (C) Plantas com três anos, cultivadas em casa de vegetação.

As plantas APx3s também revelaram-se suscetíveis à senescência, inclusive em maior grau do que a planta APx4s (dados não apresentados).

Com base nestas análises, é possível inferir que o silenciamento do gene *OsAPx4* afetou o desenvolvimento da panícula nas plantas transformadas e antecipou o processo de senescência nestas plantas.

2.3. Análises bioquímicas

As análises bioquímicas permitiram a determinação da atividade das enzimas APx, CAT e SOD. Observou-se que a atividade destas enzimas diminuiu nas plantas silenciadas quando comparadas com a planta NT, bem como os conteúdos de clorofila e peróxido de hidrogênio. Os gráficos resultantes das análises bioquímicas são apresentados na Figura 16.

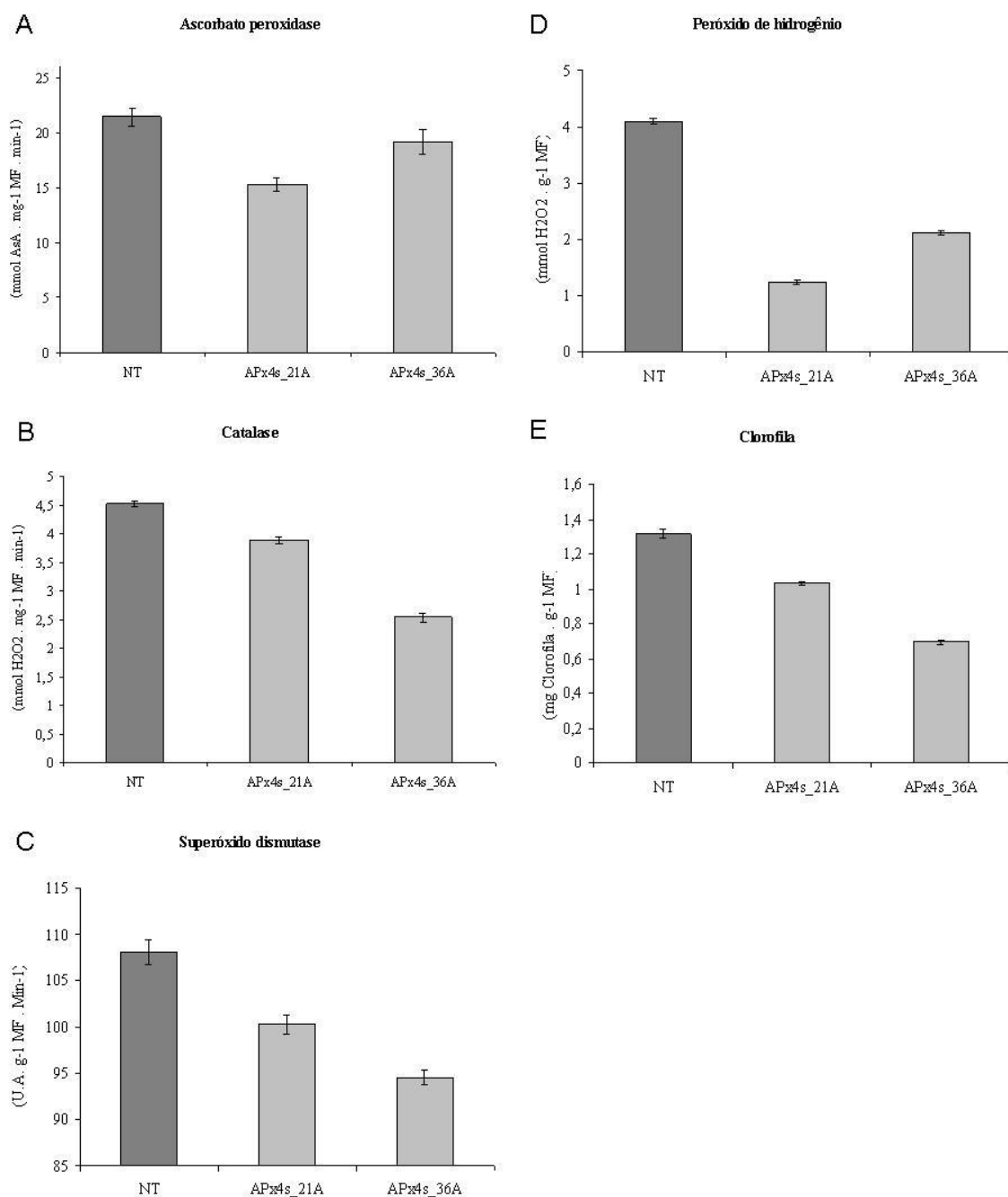


Figura 16. Análises bioquímicas das plantas NT e plantas APx4s. (A) Atividade APx; (B) Atividade de CAT; (C) Atividade de SOD; (D) Acúmulo de peróxido de hidrogênio; e (E) Conteúdo de clorofila. As análises foram feitas com folhas de plantas NT (barra escura) e plantas APx4s (barras claras) de 4 meses de idade, crescidas em condições controladas. Os valores representam a média ± EP. As análises foram feitas em triplicatas.

Estes resultados demonstram que o silenciamento de uma APx peroxissomal modula enzimas do sistema antioxidante, inclusive a enzima CAT que está presente no mesmo compartimento subcelular que a APx4. Entretanto, o acúmulo de peróxido de hidrogênio nas plantas silenciadas é menor em relação à planta NT.

2.4. Análise do padrão de expressão dos genes *OsAPx3* e *OsAPx4*

Para uma melhor caracterização destes genes, análises de RT-qPCR foram realizadas a fim de verificar o padrão de expressão das isoformas peroxissomais de APx em arroz. Estes genes foram avaliados em diferentes estágios vegetativos e reprodutivos do desenvolvimento da planta de arroz. Inicialmente, os genes *OsAPx3* e *OsAPx4* foram analisados em seis diferentes estágios vegetativos de folhas e três estágios de raiz. As folhas foram coletadas de plântulas em 7, 14 e 30 dias após a germinação e também de plantas com dois, três e quatro meses. Também foram coletadas raízes de plântulas com 7, 14 e 30 dias após a germinação (Figura 17).

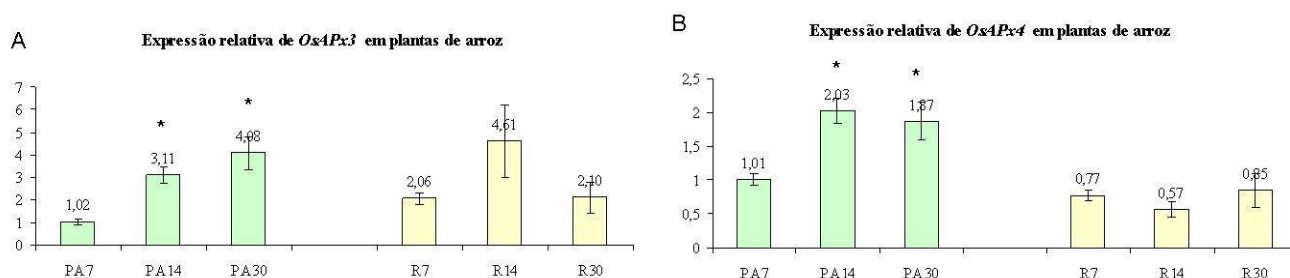


Figura 17. Expressão relativa dos genes *OsAPx3* (A) e *OsAPx4* (B) em plantas não-transformadas oriundas de sementes avaliada por RT-qPCR. Os gráficos representam a expressão dos genes *OsAPx* relativos à expressão dos genes *Fdh* e *eF* em plantas selvagens. A normalização dos resultados foi feita em relação à expressão relativa da amostra PA7. PA – parte aérea; R – raiz, com 7, 14 e 30 dias após a germinação. Os valores representam a média ± EP. As barras marcadas com asteriscos representam médias estatisticamente diferentes baseados nos resultados do Teste *t* ($P < 0,05$).

Os genes das isoformas peroxissomais de APx são mais expressos em folhas jovens, sendo que esta expressão aumenta ao longo do crescimento vegetativo. Em raízes a expressão destes genes é semelhante nos três estágios, não apresentando diferenças estatísticas.

Folhas de plantas não-transformadas com dois, três e quatro meses também foram coletadas e a expressão dos genes de APx peroxissomais foi analisada (Figura 18).

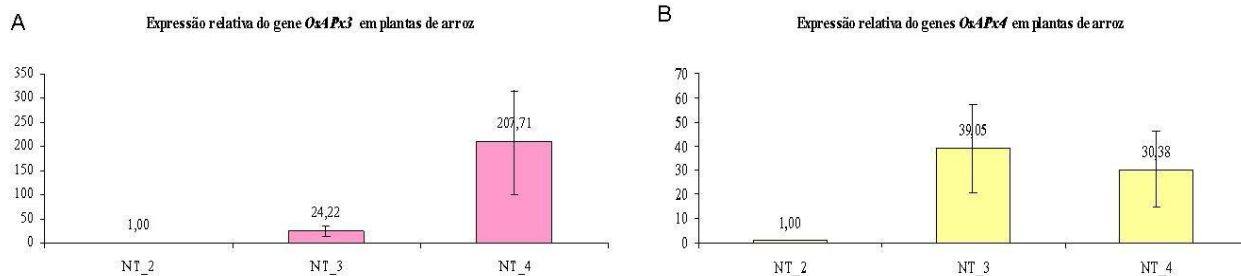


Figura 18. Expressão relativa dos genes *OsAPx3* (A) e *OsAPx4* (B) em plantas NT por RT-qPCR. Os gráficos representam a expressão dos genes *OsAPx* relativos à expressão dos genes *Fdh* e *eF* em plantas NT. A normalização dos resultados foi feita em relação à expressão relativa da amostra NT_2. Foram analisadas plantas de 2, 3 e 4 meses de idade. Os valores representam a média ± EP.

Em folhas de plantas adultas, a expressão dos genes *OsAPx3* e *OsAPx4* é diferente. O gene *OsAPx3* apresenta um aumento da sua expressão em três meses e em quatro meses ocorre uma maior indução deste gene. O gene *OsAPx4* tem sua expressão aumentada em plantas com três meses, e mantém o mesmo nível de expressão em plantas com quatro meses.

Para as análises de expressão gênica nas fases de desenvolvimento da panícula, foram analisados seis estágios de desenvolvimento: R2, R3, R4, R5, R6 e R7. Os gráficos referentes a estas análises são apresentados na Figura 19.

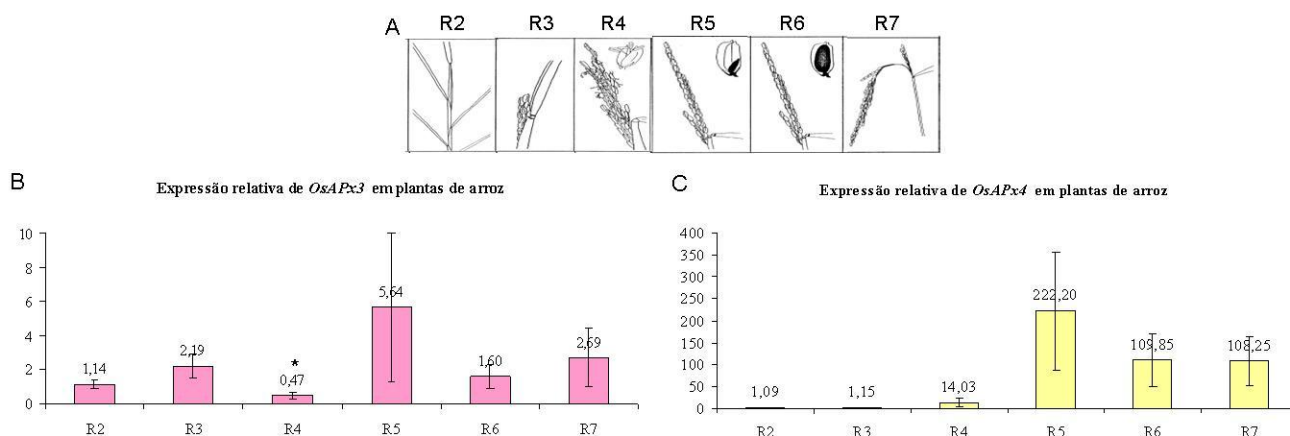


Figura 19. Expressão relativa dos genes *OsAPx3* (B) e *OsAPx4* (C) em diferentes fases do desenvolvimento da panícula de plantas de arroz selvagens por RT-qPCR. (A) Modelo esquemático representando as diferentes fases do desenvolvimento reprodutivo de arroz, de acordo com Couce et al. (2000). Os gráficos representam a expressão dos genes *OsAPx* relativos à expressão dos genes *Fdh* e *eF* em plantas selvagens. A normalização dos resultados foi feita em relação à expressão relativa da amostra R2. Foram analisadas plantas nas fases R2, R3, R4, R5, R6 e R7 do desenvolvimento da panícula. Os valores representam a média ± EP. As barras marcadas com asteriscos representam médias estatisticamente diferentes baseados nos resultados do Teste *t* ($P < 0,05$).

Os resultados das análises de RT-qPCR nas fases reprodutivas mostram expressão semelhante das duas isoformas peroxissomais de APx. Estes genes apresentam menor expressão nos primeiros estágios e, após a antese, a expressão aumenta no estágio R5, diminuindo nos estágios seguintes. Estes resultados sugerem que estes genes podem estar mais relacionados com a fase de enchimento de grão do que com as fases de fecundação.

2.5. Estudo de promotores

Após a transformação com os vetores para estudo de promotores, calos de arroz foram selecionados em meio de cultura com higromicina. Os calos que cresceram em meio de seleção foram utilizados para confirmar a expressão do gene *gus* sob controle da sequência promotora dos genes de APx peroxissomais. Os calos foram coletados e incubados no substrato *X-gluc* a 37 °C por 16 h. Após este período foi possível observar a expressão do *gus* nos calos transformados (Figura 20). Dos calos transformados com a construção pProm3, somente um evento (pProm3A) apresentou reação positiva no ensaio com *X-gluc* e dos calos transformados com a construção pProm4 foram obtidos sete eventos de calos com coloração azul.

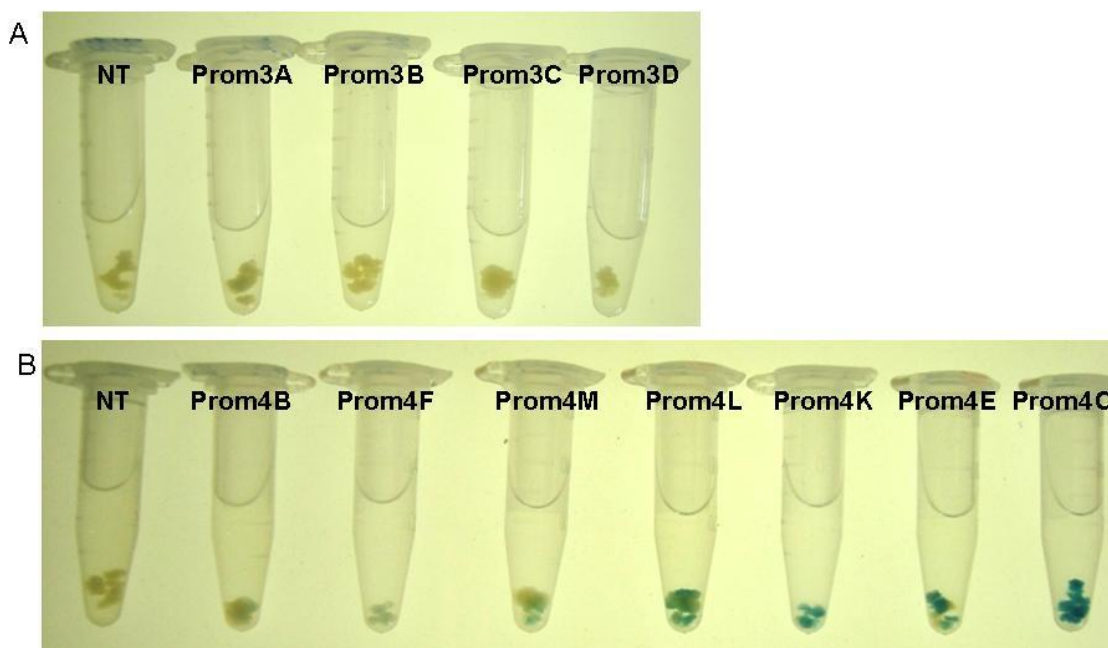


Figura 20. Análise da expressão de *Gus* em calos de arroz transformados com as construções pProm3 (A) e pProm4 (B). Os calos foram incubados em substrato *X-gluc* a 37 °C por 16 horas.

Os calos com expressão positiva de *Gus* para a construção pProm4 foram selecionados e regeneraram plantas inteiras, e estas foram incubadas no substrato *X-gluc* para visualização do padrão de expressão da sequência promotora do gene *OsAPx4*. Os calos transformados com o vetor para análise do padrão de expressão da sequência promotora do gene *OsAPx3* encontram-se em fase de regeneração. Sendo assim, os dados apresentados são referentes ao promotor do gene *OsAPx4*. Foram utilizadas duas diferentes linhagens de plantas transformadas com a sequência promotora de APx4 para as análises de expressão de *Gus*.

Plantas de diferentes idades foram utilizadas para as análises de expressão do promotor. Tecidos de folhas, raízes, panícula, assim como plântulas inteiras foram coletados e incubados no substrato *X-gluc* (Figura 21).

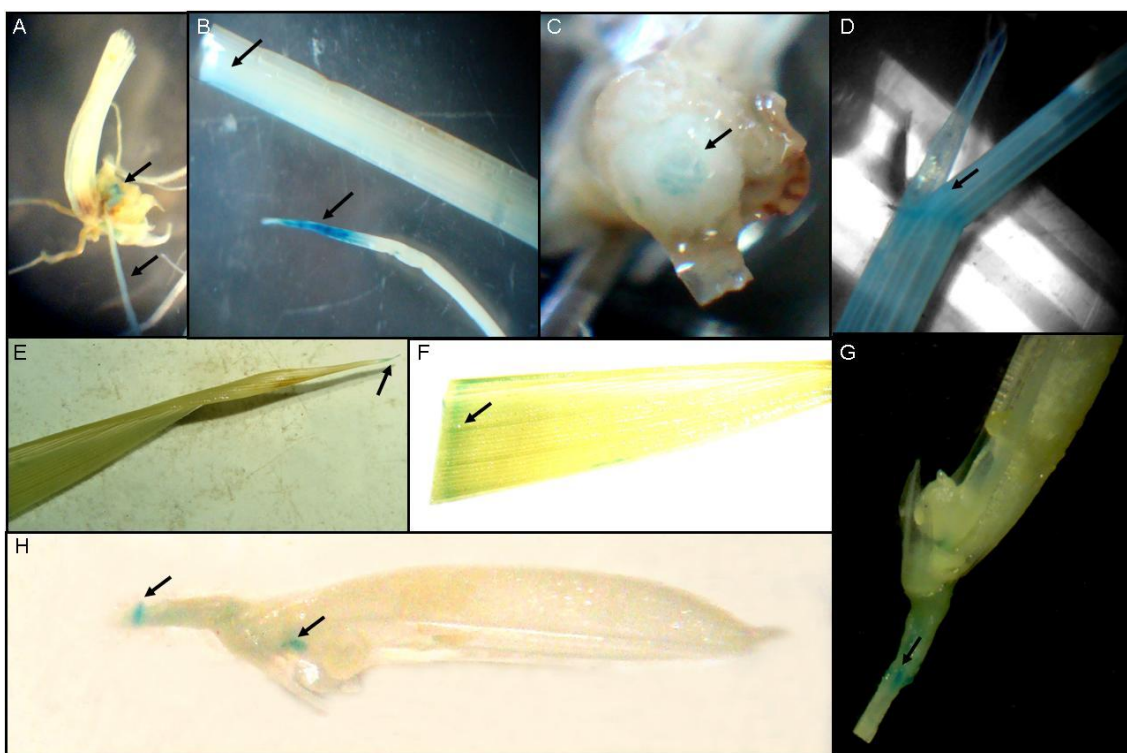


Figura 21. Plantas de arroz transformadas com a sequência promotora do gene *OsAPx4*. (A) Plântula de 45 dias com expressão de *Gus* na região da base do caule e raízes; (B - D) Planta de 60 dias com expressão de *Gus* em folha e ponta de folha (B), no cilindro central (C) e na região de nó de emissão foliar (D); (E - H) plantas com 7 meses de idade com expressão de *Gus* em ponta de folha (E) e lâmina foliar (F) e na região de nó do pedúnculo e base do carpelo da flor (G e H). Os ensaios histoquímicos de *Gus* foram realizados incubando o material vegetal no substrato *X-gluc* a 37 °C por 16 horas. As plantas apresentadas nesta foto são representativas de duas diferentes linhagens de plantas transformadas com o vetor pProm4. As setas indicam a região de expressão do gene *Gus*.

Com base nos resultados obtidos, nota-se que o gene *OsAPx4* tem sua expressão mais concentrada nas folhas, região de nós, raiz e na região basal da flor do arroz.

Cortes histológicos destes tecidos foram analisados e a marcação de *Gus* foi verificada nas células do mesofilo foliar (Figura 22A). Apesar das análises *in silico* e da avaliação da expressão por RT-qPCR mostrarem expressão baixa do gene *OsAPx4* nas raízes, foi detectada coloração de *Gus* em dois tecidos de raízes das plantas transformadas com a sequência promotora deste gene. Como exposto na Figura 22 (B – E), foi detectada marcação nas células da exoderme do córtex e em células parenquimáticas associadas ao xilema no cilindro central.

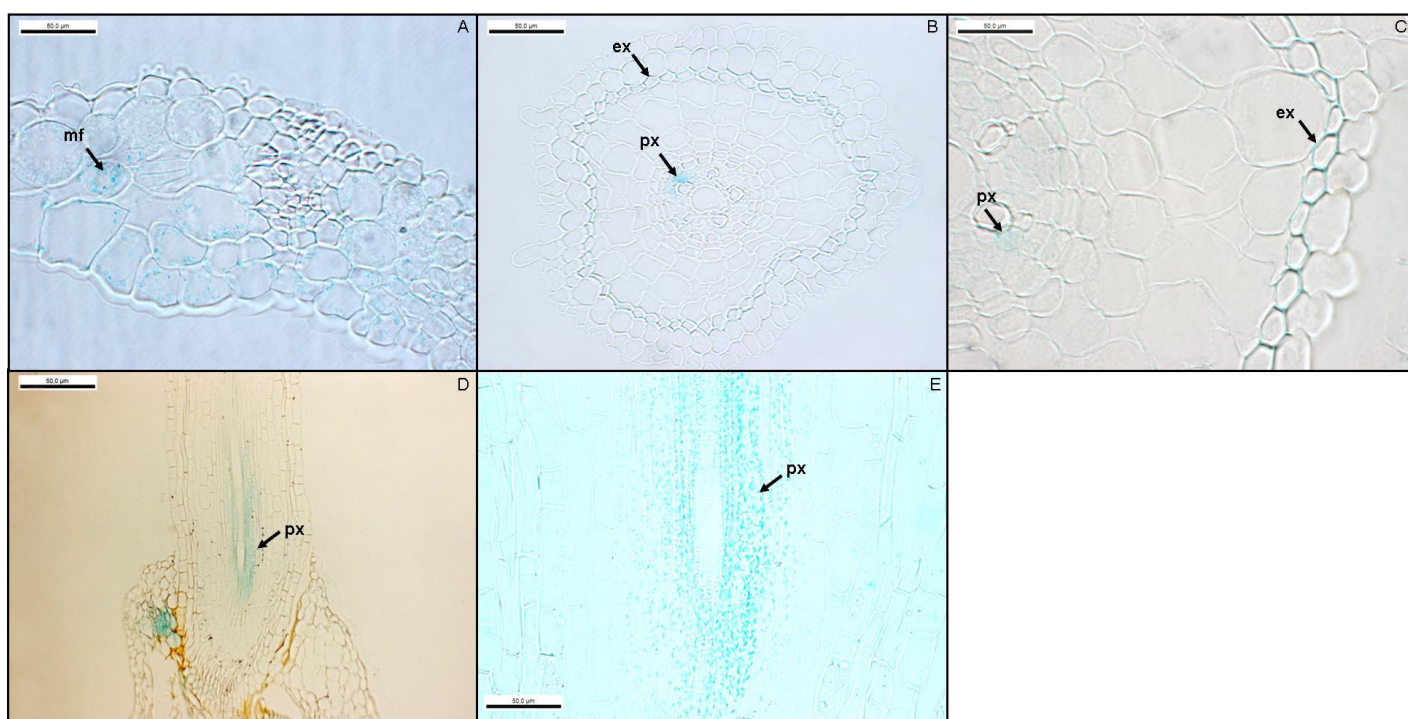


Figura 22. Cortes histológicos de plantas de arroz transformadas com a sequência promotora do gene *OsAPx4*. (A) Corte da lâmina foliar com expressão de *Gus* nas células do mesofilo foliar (mf); (B - E) Corte de raiz com expressão de *Gus* nas células da exoderme (ex) (B e C) e nas células parenquimáticas associadas ao xilema no cilindro central (px) (B - E). Para estas análises foram utilizadas plantas de 45 dias. Os ensaios histoquímicos de *Gus* foram realizados incubando o material vegetal no substrato *X-gluc* a 37 °C por 16 horas. mf – mesofilo foliar, ex – exoderme e px – parênquima do xilema.

2.6. Hibridização *in situ*

O experimento de hibridização *in situ* permitiu visualizar a expressão dos transcritos nos tecidos da planta. Foram analisados tecidos de flores de arroz selvagem

(var. Nipponbare) nos estágios de desenvolvimento da panícula R0 e R2, utilizando quatro sondas específicas. A detecção do RNA mensageiro nas flores foi possível nos dois estágios analisados.

Após o emblocamento do material em paraplast e montagem das lâminas, foi realizado um teste para verificar a preservação do RNA mensageiro no tecido fixado. Este teste é feito utilizando-se o corante fluorescente Acridine Orange, que cora o RNA mensageiro em cor laranja. Este teste foi realizado nos tecidos de flores em estágio R2 e foi possível a detecção do RNA conservado nesta amostra. A Figura 23 apresenta o resultado do teste com Acridine Orange, detectando-se o RNA nos tecidos de anteras e ovários.

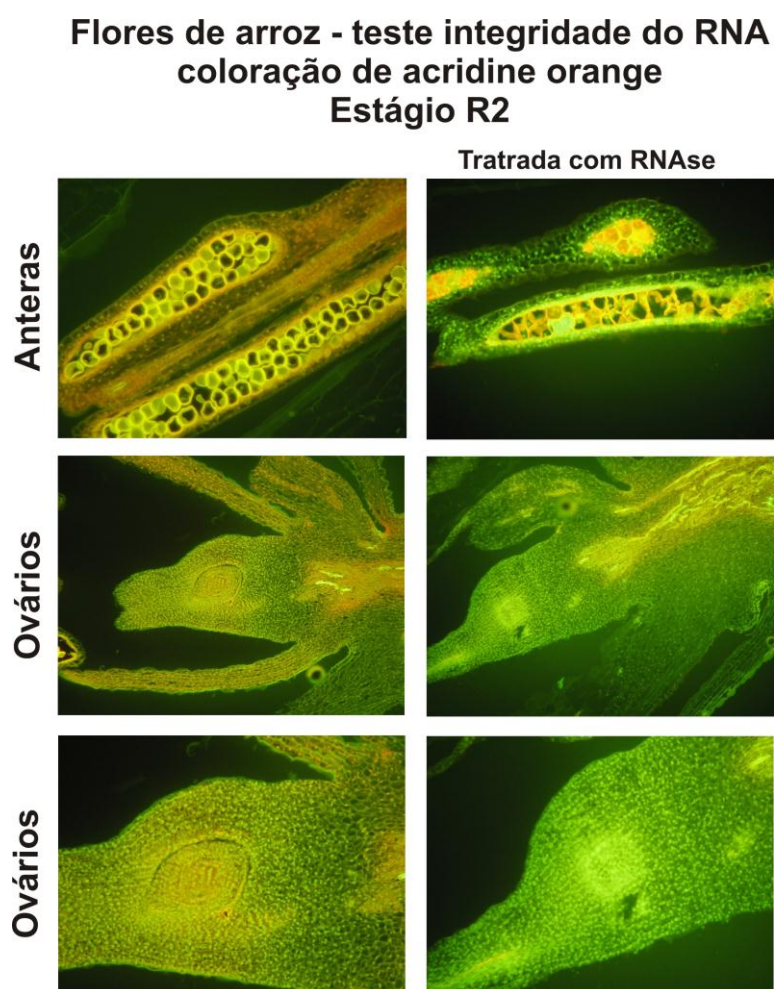


Figura 23. Teste de Acridine Orange em tecidos de flor de arroz selvagem em fase R2 do desenvolvimento da panícula. Foram testados tecidos de anteras e ovários. Na coluna da esquerda estão os tecidos não tratados com RNase e na coluna da direita os tecidos tratados com RNase, comprovando a preservação de RNA nestes tecidos.

A partir do teste de Acridine Orange, iniciou-se o experimento de hibridização *in situ*. As lâminas com os cortes de tecidos foram incubadas com as sondas para

hibridização e, após uma série de lavagens, foi realizada a detecção do sinal de hibridização. Foram utilizadas quatro sondas neste experimento, sendo uma sonda antisenso para o gene *OsAP3* como controle positivo, uma sonda senso para o gene *OsAPx4* como controle negativo, uma sonda antisenso para o gene *OsAPx3* e uma sonda antisenso para o gene *OsAPx4*. As análises foram feitas sempre comparando o sinal de hibridização nos tecidos das sondas em relação à sonda controle (*APx4* senso). As Figuras 24, 25, 26 e 27 apresentam os resultados obtidos no experimento de hibridização *in situ*.

Em relação ao gene *OsAPx3*, o sinal detectado foi muito baixo e restrito, sendo apenas visualizado nos vasos condutores do carpelo no estágio R2 (Figura 24).

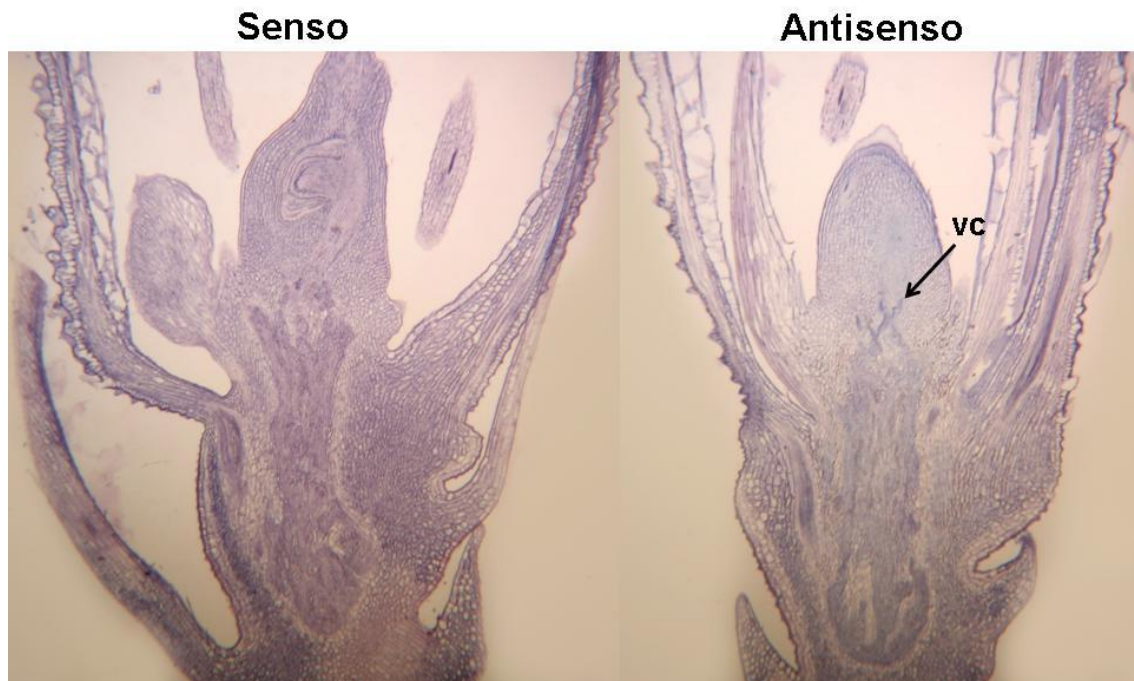


Figura 24. Expressão do gene *OsAPx3* nos vasos condutores do carpelo de flor de arroz selvagem na fase R2 por hibridização *in situ*. Corte longitudinal em aumento de 20x, com sondas em concentração de 5x. Foto da esquerda sonda senso e foto da direita sonda antisenso. vc - vasos condutores.

Em relação ao gene *OsAPx4*, sua expressão foi detectada em tecidos de flor nos estágios R0 e R2. Em R0 o sinal foi detectado no esclerênquima fibroso da lema (Figura 25).

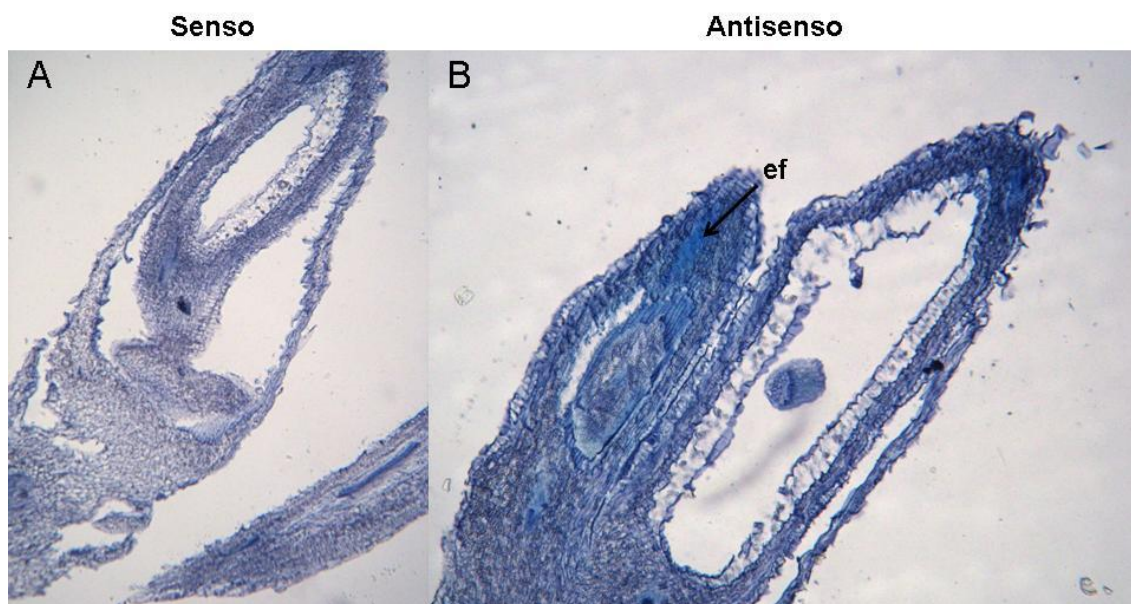


Figura 25. Expressão do gene *OsAPx4* em tecido do esclerênquima fibroso da lema de flor de arroz selvagem na fase R0 por hibridização *in situ*. (A – B) Corte longitudinal em aumento de 40x, com sondas em concentração de 2x. Foto da esquerda sonda senso e foto da direita sonda antisenso. ef - esclerênquima fibroso.

Em R2, o sinal de expressão foi detectado em três diferentes regiões da flor: vasos condutores e parênquima do pedicelo (Figura 26) e esclerênquima fibroso da lema (Figura 27).

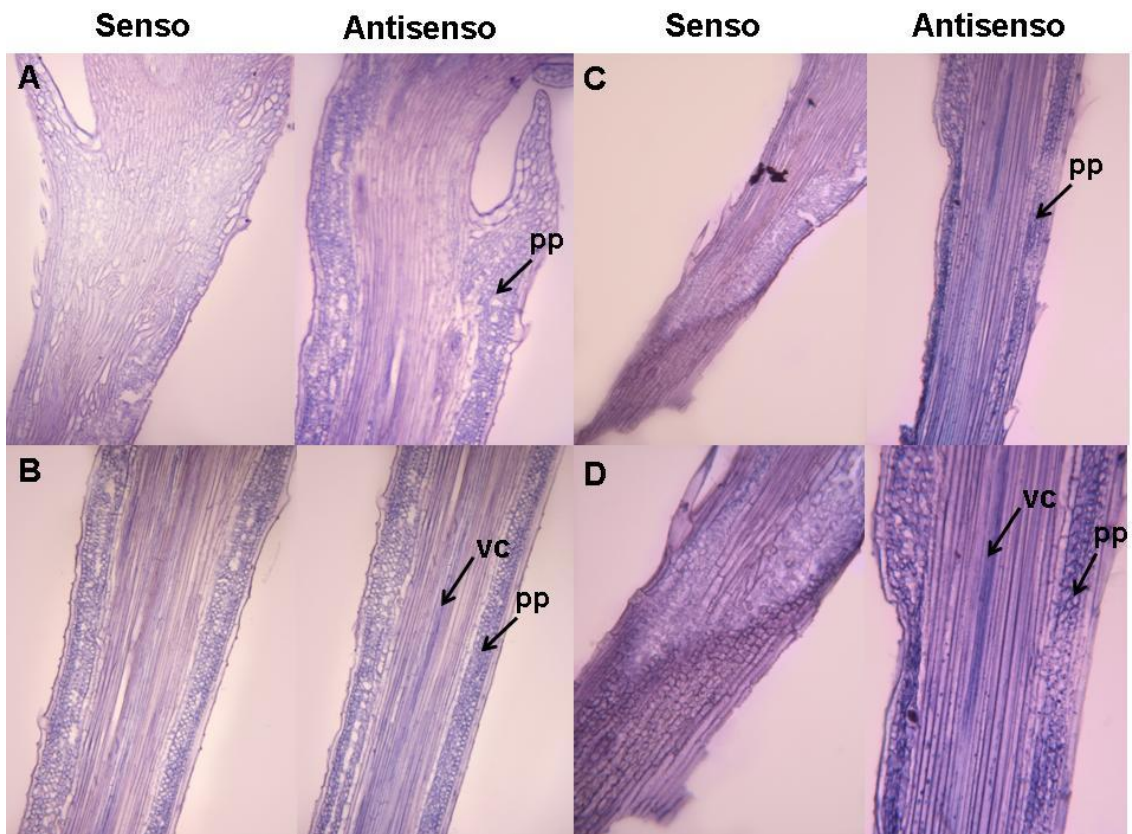


Figura 26. Expressão do gene *OsAPx4* nos vasos condutores (vc) e parênquima do pedicelo (pp) da flor de arroz selvagem em fase R2 por hibridização *in situ*. (A – C) Corte longitudinal em aumento de 40x; e (B – D) Corte longitudinal em aumento de 80x. Sondas em concentração de 1x. Fotos da esquerda sonda senso e fotos da direita sonda antisense. vc - vasos condutores, pp – parênquima do pedicelo.

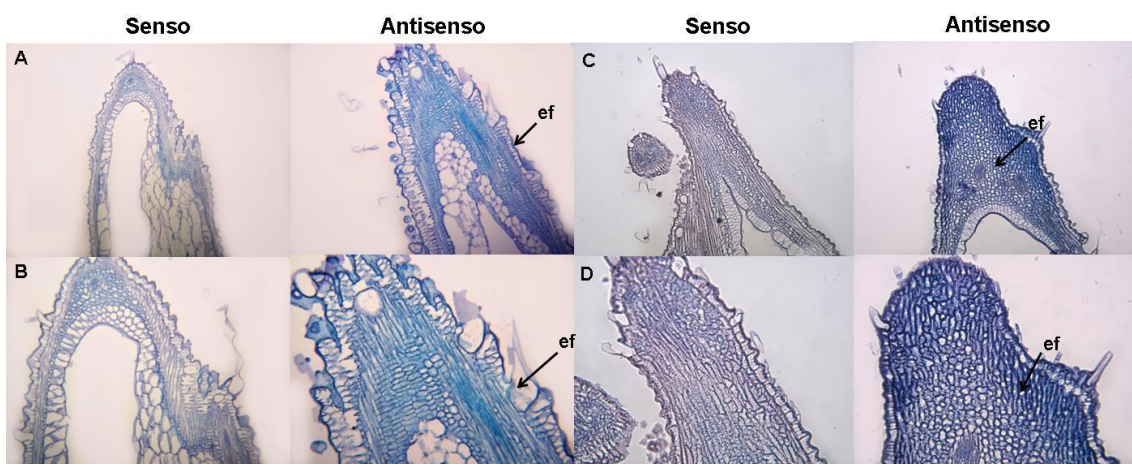


Figura 27. Expressão do gene *OsAPx4* na região do esclerênquima fibroso (ef) da lema da flor de arroz selvagem em fase R2 por hibridização *in situ*. (A – B) Corte longitudinal em aumento de 20x (A) e 40x (B), com sondas em concentração de 10x; (C – D) Corte longitudinal em aumento de 40x (C) e 80x (D), com sondas em concentração de 2x. Fotos da esquerda sonda senso e fotos da direita sonda antisense. ef – esclerênquima fibroso.

2.7. Genes marcadores de senescência

Conforme verificado na caracterização fenotípica, as plantas de arroz silenciadas para os genes *OsAPx3* e *OsAPx4* mostraram-se mais suscetíveis ao processo de senescência. Para investigar se esse processo estaria de fato alterado nas plantas silenciadas APx4s pela modulação deste gene, foram feitas análises de expressão de genes marcadores de senescência.

Dois experimentos foram realizados para esta análise. No primeiro foram coletadas folhas de plantas de arroz não-transformadas com idades de dois, três e quatro meses e no outro experimento foram coletadas folhas jovens, intermediárias e folhas mais velhas de plantas de arroz não-transformadas e APx4s com idade de seis meses.

Através da técnica de RT-qPCR seis genes de arroz já descritos como marcadores de senescência foram analisados, porém apenas quatro genes apresentaram sinais de modulação da expressão em resposta ao silenciamento do gene *OsAPx4*. Os genes *OsIM* e *OsRbcaL* não indicaram diferenças de expressão entre as amostras. A Figura 28 apresenta os resultados das análises de expressão dos genes *OsLip*, *OsNAP*, *OsI2* e *OsWRKY* nas condições do experimento.

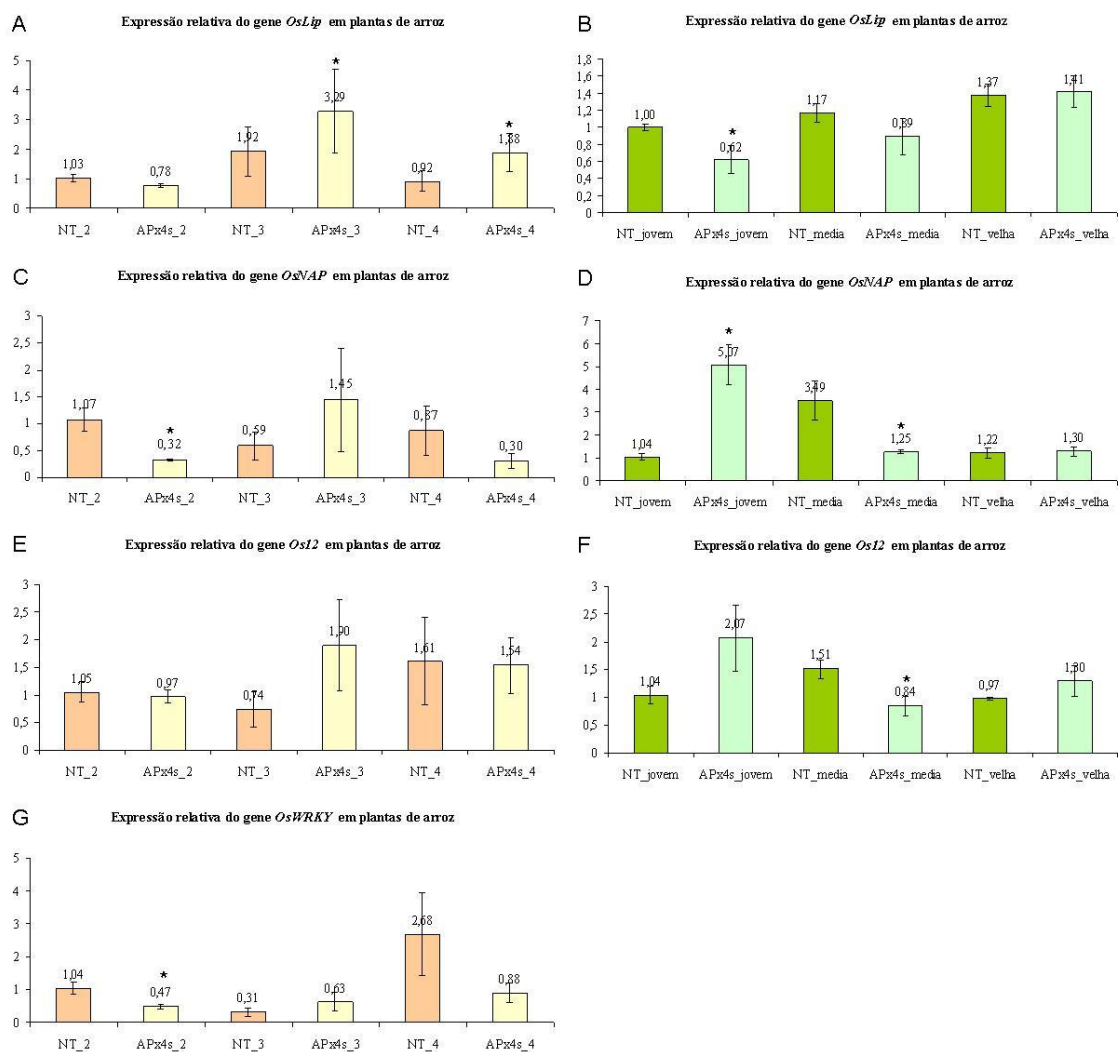


Figura 28. Expressão relativa dos genes *OsLip* (A e B) e *OsNAP* (C e D), *Os12* (E e F) e *OsWRKY* (G) em plantas de arroz não-transformadas (NT) e plantas silenciadas de duas linhagens de APx4s. Os gráficos representam a expressão dos genes relativos à expressão dos genes *Fdh* e *eF*. A normalização dos resultados foi feita em relação à expressão relativa da amostra NT_2 para o experimento com plantas de 2, 3 e 4 meses de idade e da amostra NT_jovem para o experimento com folhas de estágios diferentes de plantas NT e APx4s. Os números 2, 3 e 4 representam a idade em meses das plantas. As designações jovem, média e velha representam a folha selecionada para extração: a última folha, uma folha intermediária e a folha verde mais externa, respectivamente. Os valores representam a média \pm EP. As barras marcadas com asteriscos representam médias estatisticamente diferentes baseados nos resultados do Teste *t* ($P < 0,05$).

O gene *OsLIP* apresentou maior expressão em plantas com três meses, e aos quatro meses ocorreu uma queda na sua expressão, tanto em plantas NT quanto em plantas APx4s, porém a expressão deste gene em plantas APx4s com quatro meses foi maior do que em plantas NT. Analisando as folhas de diferentes fases de desenvolvimento, notou-se que a expressão de *OsLip* foi menor nas folhas jovens de plantas APx4s. Um dado interessante é a diferença nos níveis de expressão do gene nas

plantas NT e APx4s, sendo que nas plantas transformadas o acúmulo de transcritos foi menor nas folhas jovens, aumentando nas folhas mais velhas.

O gene *OsNAP* teve um nível de expressão menor nas plantas APx4s com dois meses. Em relação às folhas das plantas de seis meses, este gene apresentou maior nível de expressão nas folhas jovens das plantas APx4s e depois ocorreu uma queda na expressão. Pode-se notar que a indução de expressão desses genes nas plantas APx4s acontece em um período anterior ao das plantas NT, o que pode sugerir que alguns processos envolvidos na senescência estão alterados, não necessariamente pela indução precoce de genes envolvidos na senescência, mas talvez pela modulação da expressão destes em fases diferentes quando comparados à planta controle.

O gene *OsWRKY*, também envolvido nos processos de senescência, teve sua expressão reduzida nas plantas APx4s com dois meses.

3. Discussão

Plantas silenciadas ou nocautes para diferentes isoformas de APx em várias espécies de plantas têm sido obtidas, resultando em fenótipos diferentes. Alguns trabalhos já apresentaram plantas com expressão reduzida de ascorbato peroxidase e seus fenótipos. Plantas silenciadas para as isoformas de APx citosólicas de arroz apresentaram o fenótipo alterado, como nanismo, crescimento atrofiado e ausência de floração (Rosa et al., 2010). Plantas nocaute para o gene *AtAPx1* tiveram seu crescimento atrofiado e floração tardia (Davletova et al., 2005). Por outro lado, as plantas nocautes para APxs cloroplastídicas não mostraram diferenças no fenótipo, em comparação com plantas não-transformadas (Davletova et al., 2005; Miller et al., 2007). No presente trabalho, as isoformas peroxissomais de APx de arroz (APx3 e APx4) foram silenciadas e as plantas apresentaram algumas diferenças no crescimento e desenvolvimento quando comparadas às plantas não-transformadas.

Neste trabalho, foram obtidas seis linhagens transgênicas altamente silenciadas no gene *OsAPx4*, aproximadamente 99% (Figura 10). Estas plantas foram mantidas em casa de vegetação, onde características de crescimento e desenvolvimento foram analisadas. As plantas apresentaram um leve atraso no desenvolvimento da panícula e senescência antecipada (Figuras 11 a 14).

Vários genes codificando APxs peroxissomais já foram identificados em abóbora, algodão, espinafre, mamona, girassol, pepino, *Arabidopsis* e arroz (Shigeoka et al., 2002; Teixeira et al., 2004). Quando a isoforma peroxissomal APx3 de *Arabidopsis thaliana* foi silenciada, as plantas não apresentaram nenhuma deficiência no crescimento ou desenvolvimento (Narendra et al., 2006), mas a superexpressão desta isoforma resultou em uma maior produção de sementes sob estresse de seca e maior tolerância destas plantas a estresse por 3-AT (inibidor de catalase) (Yan et al., 2003). A superexpressão de uma APx peroxissomal de cevada também levou ao aumento da tolerância a altas temperaturas (Shi et al., 2001). Uma espécie de tomate (*Lycopersicon pennellii*) resistente ao estresse salino apresentou maior atividade das enzimas antioxidantes SOD, APx, MDHAR e CAT, quando comparada com uma espécie sensível ao sal (Mittova et al., 2003) e uma isoforma de APx peroxissomal isolada de *Avicennia marina* foi induzida em plantas submetidas a diversos estresses abióticos (Kavitha et al., 2008), mostrando que estas isoformas são importantes em respostas a estresses. As APxs peroxissomais de arroz também têm sua expressão induzida em resposta a estresses. Plantas de arroz submetidas a estresse hídrico e tratamento com peróxido de hidrogênio exógeno sofreram indução dos genes *OsAPx3* e *OsAPx4* (Rosa et al., 2010).

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

Para a caracterização das isoformas peroxissomais, além da análise fenotípica, foram realizadas também análises de expressão dos genes *OsAPx3* e *OsAPx4*. Estudando o nível de transcritos dos genes de APx peroxissomais em plântulas de arroz com 7, 14 e 30 dias após a germinação, observa-se que estes genes são pouco expressos em raízes, entretanto, a expressão em folhas é maior e aumenta nos períodos de 14 e 30

dias (Figura 17). O nível de expressão de uma APx peroxissomal de abóbora também foi quantificado nos estágios iniciais e foi detectada maior expressão da proteína no período de três a sete dias após a germinação e após o sétimo dia a expressão decresceu. A modulação da expressão da APx de abóbora é relacionada com a presença de peroxissomos do tipo glioxissomos, diminuindo a expressão na fase em que os glioxissomos passam a ser peroxissomos foliares (Nito et al., 2001). Em plantas de arroz com dois, três e quatro meses (adultas) nota-se a mesma indução da expressão dos genes de APx peroxissomais em plantas mais velhas, com três e quatro meses, quando comparadas às plantas com 2 meses (Figura 18). Análises *in silico* em banco de dados de expressão de genes de arroz, como Geninvestigator (<https://www.geneinvestigator.com/gv>), RiceXPro (<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/index.html>) e Rice Oligonucleotide Array Database (<http://www.ricearray.org/nsfarray/nsfarray.shtml>) comprovam maior expressão dos genes *OsAPx3* e *OsAPx4* em tecidos, tanto de folhas jovens como de folhas maduras, perfilhamento e fase de alongamento do caule (Figura 29). Trabalhos prévios do nosso grupo também analisaram a expressão destes genes em tecidos de plantas de arroz e estes dados corroboram nossos resultados, apresentando maior expressão dos genes em folhas e parte aérea de plântulas (Teixeira et al., 2006). Ao contrário da expressão da APx de abóbora, as isoformas de APx peroxissomais de arroz têm sua expressão aumentada nos estágios tardios de desenvolvimento, onde a maior quantidade de peroxissomos é do tipo foliar, permanecendo alta a expressão também na fase de transição do peroxissomo foliar para gerontossomo, no estágio de senescência. Isto pode indicar que as APxs de arroz estão relacionadas tanto com a fotorespiração quanto com a senescência.

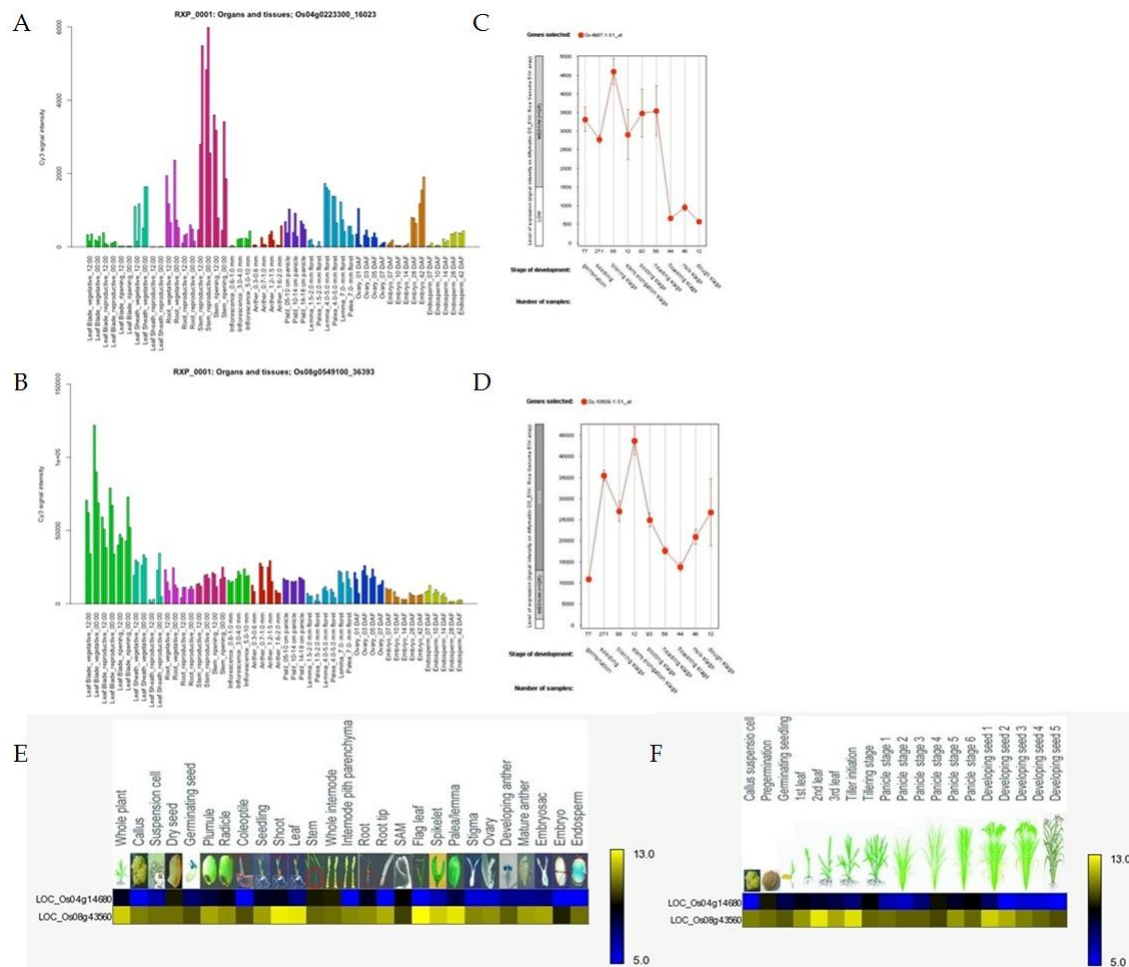


Figura 29. Análises *in silico* em bancos de dados de expressão de genes de arroz. (A e B) Análise da expressão dos genes *OsAPx3* (A) e *OsAPx4* (B) em diferentes órgãos e tecidos da planta pelo RiceXPro; (C e D) Análise da expressão dos genes *OsAPx3* (C) e *OsAPx4* (D) em diferentes fases do desenvolvimento da planta pelo Geninvestigator; (E) Análise da expressão dos genes *OsAPx3* e *OsAPx4* em diferentes órgãos da planta pelo Rice Oligonucleotide Array Database; (F) Análise da expressão dos genes *OsAPx3* e *OsAPx4* em diferentes fases do desenvolvimento da planta pelo Rice Oligonucleotide Array Database. *OsAPx3* – Os04g0223300_16023, Os4987.1.S1_at, Os04g14680; *OsAPx4* – Os08g0549100_36396, Os10609.1.S1_at, Os08g43560.

O efeito do silenciamento do gene *OsAPx4* em plantas de arroz sobre a atividade de outras enzimas do sistema antioxidante também foi analisado. Plantas APx4s, além de apresentarem redução da atividade de APx, também possuem menor atividade das enzimas CAT, SOD e menor acúmulo de peróxido de hidrogênio (Figura 16). Este dado é interessante, pois ao silenciar uma APx espera-se que a quantidade de peróxido aumente na célula vegetal. Uma explicação para este menor acúmulo de peróxido de

hidrogênio é a atividade de SOD reduzida, produzindo, assim, menores quantidades da molécula de peróxido de hidrogênio. E por essas plantas apresentarem menor acúmulo de peróxido, explica-se o decréscimo na atividade de CAT. Vários trabalhos já demonstraram a modulação do sistema antioxidante pelo silenciamento de uma isoforma de APx. Plantas de tabaco com redução da expressão da isoforma APx1 apresentaram maior expressão das enzimas CuZn-SOD, CAT e GR (Rizhsky et al., 2002). A indução de enzimas do sistema antioxidante já foi verificada em outras plantas com altas quantidades de ERO (Davletova et al., 2005; Ishikawa et al., 2005; Pnueli et al., 2003) ou então o silenciamento de genes que codificam APx não resultou nenhuma alteração do nível de transcritos alterado para as outras enzimas antioxidantes (Pnueli et al., 2003).

Vários modelos já tentaram explicar a biogênese do peroxissomo. O modelo mais aceito é o “Modelo do peroxissomo semi-autônomo do retículo endoplasmático”, o qual consiste na síntese de proteínas de membrana e matriz do peroxissomo em poliribossomos livres no citosol e direcionadas para o retículo endoplasmático, para posteriormente serem enviadas a peroxissomos pré-existentes (Mullen 2006). Já foi descrito que a APx peroxissomal segue este modelo (Mullen e Trelease, 1999). Peroxissomos pré-existentes são recipientes de proteínas vindas do retículo endoplasmático (Mullen e Trelease, 2006). Baseado nestes dados, sugere-se que a falta de APx peroxissomal em plantas de arroz, pelo silenciamento da isoforma APx4, cause alguma deformação na biogênese do peroxissomo, diminuindo sua atividade e/ou viabilidade. Com isso, ocorre menor produção de superóxido, diminuindo assim a atividade da enzima SOD e o acúmulo de peróxido de hidrogênio. O peroxissomo produz superóxido como consequência do seu metabolismo normal em duas reações principais, na matriz e na membrana peroxissomal (Quan et al., 2008). O menor acúmulo de peróxido de hidrogênio nos peroxissomos promoveria uma diminuição da atividade de catalase. Entretanto, as análises feitas não são suficientes para comprovar esta hipótese e futuros experimentos deverão ser realizadas para comprovar a eficiência dos peroxissomos nas plantas APx4s.

As plantas APx4s apresentaram atraso no desenvolvimento da panícula (Figura 12). Este fenótipo não é observado com frequência em plantas mutantes silenciadas para os genes que codificam isoformas de APx. No trabalho de Pnueli et al. (2003), quando a isoforma citosólica APx1 de *Arabidopsis* foi silenciada, as plantas apresentaram atraso no desenvolvimento e florescimento tardio, entretanto os autores predizem que este

fenótipo pode estar relacionado com o acúmulo de peróxido de hidrogênio nas plantas mutantes. A quantidade de ERO nas células é importante para o desenvolvimento floral, sendo sinalizadores de alguns processos, como o desenvolvimento do tapete nas anteras de flores de arroz (Li et al., 2006).

Outro fenótipo apresentado pelas plantas APx4s é o menor número de espiguetas nas panículas. Na visão agrônômica, a arquitetura e quantidade de grãos de arroz na panícula são extremamente importantes, pois reflete sua produtividade (Ikeda et al., 2007; Sakamoto e Matsuoka, 2008). A panícula do arroz é formada pelos ramos primários e secundários e pelas espiguetas encontradas na região terminal destes ramos (Li et al., 2011). O desenvolvimento da inflorescência do arroz ocorre basicamente por três processos, sendo eles: tempo de parada do meristema da inflorescência (MI), conversão do meristema de ramos (MR) em meristema de espiguetas (ME) e mudança da identidade do meristema lateral nos ramos (Ikeda-Kawakatsu et al., 2009).

Vários genes foram descritos como reguladores do desenvolvimento floral em arroz. A planta mutante para o gene *LAX PANICLE* apresenta deficiência na iniciação do MI, resultando em um número reduzido de ramos e espiguetas (Komatsu et al., 2001). Outro gene, *APO1*, quando nocauteado em plantas de arroz, causa conversão precoce do MI em ME, também possuindo menor número de ramos primários e espiguetas (Ikeda et al., 2005; Ikeda et al., 2007), sugerindo que o nível de atividade de *APO1* regula a formação da inflorescência através do controle da proliferação celular no meristema (Ikeda-Kawakatsu et al., 2009). *PANICLE PHYTOMER2 (PAP2)/MADS34* é outro gene que também regula a identidade do ME em arroz (Gao et al., 2010; Kobayashi et al., 2010). Dois genes parecem estar envolvidos no controle do número de espiguetas, *RCN1* e *RCN2*, em que plantas superexpressando estes genes apresentam inflorescência mais ramificada e com maior número de espiguetas causado por um atraso na conversão do MR em ME (Nakagawa et al., 2002).

Entretanto, apesar de muitos genes relacionados à arquitetura da panícula já terem sido isolados, a base molecular do desenvolvimento floral ainda não é totalmente compreendida. Não é possível correlacionar a ausência do gene *OsAPx4* com o número reduzido de sementes nas plantas transformadas, mas sugere-se que o gene *OsAPx4* tenha alguma função na regulação do desenvolvimento floral, atuando junto a vias de controle do ME em arroz, ou mesmo envolvido com a atividade do peróxido de hidrogênio nas zonas de proliferação celular ou regiões de nó (Ikeda-Kawakatsu et al., 2009).

Análises de expressão do gene *OsAPx4* foram feitas em tecidos de plantas de arroz. Para verificar o padrão de expressão, plantas de arroz foram geradas expressando a fusão da sequência promotora do gene *OsAPx4* com o gene *Gus*. As plantas transformadas apresentaram fenótipo semelhante à planta não-transformada indicando que a fusão PROM4:GUS não alterou o desenvolvimento da planta. A atividade de *Gus* foi examinada histoquimicamente em plantas transformadas e como resultado detectou-se a expressão de PROM4:GUS no caule (Figura 21A), em folhas (Figuras 21B, D, E e F e 23A), sistema vascular (Figuras 21C e 22E) e espiguetas (Figura 21H e I). Nas Figuras 21D e G nota-se que o sinal de *Gus* foi detectado em regiões de nó, onde ocorre transição de tecidos. Estudo de expressão de promotor já foi realizado com outra isoforma de APx de arroz, onde a sequência promotora do gene *OsAPx2* mostrou regular a expressão da proteína repórter *Gfp* de maneira constitutiva, com altos níveis de expressão em tecidos vegetativos e reprodutivos, sendo considerado um potencial promotor constitutivo para a transformação de plantas de arroz (Park et al., 2010). A expressão da sequência promotora do gene *OsAPx4* é menos intensa, não sendo facilmente detectada em todas as fases do desenvolvimento da planta.

A expressão de APx4 foi detectada em tecidos do mesofilo foliar (Figura 22A) e é esperada pelo fato de que nestes tecidos a taxa fotossintética é maior e, assim, a fotorespiração é induzida e realizada pelos peroxissomos foliares (Zimmermann et al., 2006). A coloração de *Gus* também foi identificada na região da lígula, área de expansão foliar. Em monocotiledôneas, o crescimento foliar é restrito à base da folha, na região onde ocorre a divisão e expansão celular (Langer, 1979). Alguns trabalhos relacionam a ocorrência de altos níveis de ERO nas zonas de expansão celular (Miller, 1986; Fry, 1998; Schweikert et al., 2000; Schopfer, 1994) e que o crescimento está relacionado com o nível de acúmulo de espécies reativas de oxigênio (Rodriguez et al., 2002). A região da lígula também é uma área de nó, e nesta área pode ocorrer uma reorientação do crescimento por gravitropismo. Já foi relatada a relação de ERO com resposta gravitrópica no crescimento de caules, sendo regulada pelo hormônio auxina (Swanson e Gilroy, 2010).

Neste trabalho foi possível detectar a expressão de APx4 no sistema vascular das plantas, tanto no cilindro central de raízes como no pedicelo das espiguetas. O gene *AtCAT3* de *Arabidopsis*, que codifica uma isoforma da enzima catalase, teve sua expressão detectada no sistema vascular de plantas, co-localizando com a região de grande concentração de peróxido de hidrogênio durante o desenvolvimento foliar

(Zimmermann et al., 2006), sugerindo que *AtCAT3* possa ser induzido por altos níveis do substrato. Não é conhecido ainda o motivo que causa o acúmulo de peróxido de hidrogênio na área do sistema vascular, mas suspeita-se que o peróxido de hidrogênio seja transportado pelos vasos como molécula sinalizadora (Zimmermann et al., 2006), principalmente na comunicação a longas distâncias (Corpas et al., 2004). As células companheiras e as células do parênquima do xilema, responsáveis pelo transporte de água e substâncias dissolvidas, também atuam na regulação do floema (Van Bel, 1993). A presença de enzimas antioxidantes, do tipo APx, na região do sistema vascular pode provavelmente ser atribuída à manutenção da integridade das células companheiras e do parênquima do xilema, protegendo-as contra os danos oxidativos causados pelo processo de senescência e, assim, facilitar a relocação e reciclagem de nutrientes das folhas senescentes para os tecidos adjacentes (Kang et al., 2009). Além da expressão de *Gus* nas células parênquimáticas do xilema na raiz, foi detectada a expressão nas células da exoderme. A exoderme é a camada (uni ou multiestratificada) mais externa do córtex da raiz, relacionada à “filtragem” de água e solutos que são absorvidos pela raiz (Apezzato-da-Glória e Carmello-Guerreiro, 2006), funcionando como barreira protetora do córtex.

Foi detectada a expressão de APx4 em tecidos de panícula nas análises de fusão PROM4:GUS e, tendo a planta silenciada apresentado um fenótipo com alteração no desenvolvimento da panícula, um maior enfoque foi dado a este órgão. Inicialmente foi realizada uma análise por PCR em tempo real para verificar o padrão de expressão dos genes *OsAPx3* e *OsAPx4* durante o desenvolvimento da panícula do arroz. Foram coletados tecidos de panículas em seis estágios do desenvolvimento, onde foi verificado que os genes de APx peroxissomais apresentaram baixa expressão nas fases iniciais, tendo um pico no estágio R5 e depois apresentando uma queda na expressão (Figura 19). O estágio R5 se caracteriza por suceder a antese, em que se inicia a fase de enchimento do grão (Couce et al., 2000).

Para uma análise mais detalhada da expressão de APx3 e APx4 em espiguetas de arroz, um experimento de hibridização *in situ* foi conduzido. Para este experimento foram coletadas espiguetas de arroz em dois estágios do desenvolvimento da panícula, R0 e R2.

O gene *OsAPx4* teve sua expressão detectada nos vasos condutores do pedicelo das espiguetas (Figura 26). O pedicelo é uma estrutura que tem como funções básicas a sustentação da espiguetas e a condução de nutrientes (Yoshida e Nagato, 2011). A

emissão da panícula depende do alongamento do pedúnculo, que por sua vez é mediada por sinais ambientais (Muthurajan et al., 2011). O transporte de carboidratos e a nutrição mineral da panícula são importantes funções do pedúnculo, dando suporte ao enchimento dos grãos e amadurecimento das panículas (Muthurajan et al., 2011). A nutrição da panícula é feita pelo sistema vascular presente no pedúnculo e pedicelo. A maior parte da sacarose que entra no sistema vascular é transportada para órgãos adjacentes, como a panícula (Ji et al., 2005). O sistema vascular é formado por vasos primários e secundários, distribuídos transversalmente e longitudinalmente, conectando as células. A transferência inicial de carbono possivelmente ocorre nos vasos primários e secundários, em que os secundários se localizam em todas as células e atuam na recuperação de um eventual vazamento de sacarose nas células do parênquima (Ji et al., 2005). Em trabalho publicado recentemente foi verificado que em plantas de arroz da cultivar *japonica*, cada vaso principal do sistema vascular é conectado a um ramo primário da panícula (Terão et al., 2010). Alguns estresses estão relacionados com o alongamento do pedúnculo. Plantas submetidas a estresse hídrico apresentam redução do alongamento do pedúnculo e atraso na antese (He et al., 2009). Por essa região ser suscetível à ação de fatores externos, a presença de enzimas do sistema antioxidante, como APx, é importante no combate a injúrias neste tecido. Além dos vasos condutores, foi detectada a expressão da isoforma APx4 em tecidos do parênquima do pedicelo, provavelmente um tecido com função fotossintética.

Outro componente da panícula onde foi detectada a expressão do gene *OsAPx4* é a lema (Figura 26). A lema, junto com a pálea, são órgãos do perianto específicos de gramíneas que envolvem os órgãos florais internos, os lodículos, estames e pistilo (Yoshida e Nagato, 2011; Yuan et al., 2009). A lema geralmente possui uma epiderme com camadas de células silicificadas, podendo apresentar tricomas, e possui cinco botões vasculares, diferente da pálea que apresenta três. A principal função da pálea e lema é proteger as flores do ataque de insetos e patógenos, além de fornecer carboidratos para as sementes em desenvolvimento (Abebe et al., 2004). Na Figura 26 observa-se que aparentemente a expressão do gene *OsAPx4* se localiza nas células que compõem o tecido do esclerênquima fibroso (Prasad et al., 2005). No estágio R0, a expressão de APx4 também pode ser detectada no esclerênquima fibroso (Figura 24). Este tecido deve estar relacionado com a sustentação da estrutura para compor o órgão floral.

O gene *OsAPx3* somente teve sua expressão detectada em tecidos do estágio R2, na região dos vasos condutores do carpelo (Figura 23). Por ter um número restrito de análises, pouco se pode inferir sobre a função e atividade da isoforma APx3. Entretanto, este gene pode também estar relacionado com a proteção dos vasos condutores nas plantas de arroz.

Sendo assim, as análises sugerem que *OsAPx4* é expresso em toda planta, com maior expressão em folhas, sistema vascular e panícula, o que corrobora com os dados de análises *in silico* e possui relação com o fenótipo observado nas plantas RNAi.

As plantas APx4s mostraram maior suscetibilidade à senescência. Nas Figuras 14 e 15 pode-se notar maior quantidade de folhas secas nas plantas silenciadas em relação à planta não-transformada. Análises de expressão do gene *OsAPx4* em tecidos de folhas de plantas de arroz por RT-qPCR revelaram que este gene é mais expresso em plantas adultas (Figura 18) e teste de coloração de *Gus* com a fusão PROM4:GUS mostrou expressão da sequência promotora de APx4 em pontas senescentes de folhas (Figuras 21B e E).

A análise bioquímica do conteúdo de clorofila em folhas de plantas APx4s revelou menor quantidade de clorofila nas plantas silenciadas em relação à planta não-transformada (Figura 16E). O conteúdo de clorofila é um dos principais marcadores de senescência foliar (Lim et al., 2007), pois durante o processo de senescência os cloroplastos são eliminados, diminuindo a quantidade de clorofila nas plantas (Wan e Liu, 2008). De fato, genes associados à fotossíntese, e ao processo fotossintético, são reduzidos na senescência (Gepstein et al., 2003).

Diferentes características agrônômicas importantes, como o número e a qualidade das sementes, tempo de germinação, amadurecimento do fruto, são afetados pela senescência (Zentgraf et al., 2010). A senescência ocorre naturalmente em todas as plantas e é um processo altamente regulado e organizado, no qual ocorre a remobilização de macromoléculas de folhas verdes maduras para tecidos jovens ou desenvolvimento de sementes (Zentgraf et al., 2010), evitando a morte celular até a total realocação dos recursos (Price et al., 2008). As folhas das plantas são responsáveis pela fotossíntese, fonte de recursos para a vida vegetal, e sua longevidade é bastante influenciada pela quantidade de nutrientes disponível, luz e outros fatores ambientais (Price et al., 2008).

Diversos genes participam do processo de senescência, incluindo genes que codificam proteases, nucleases, clorofilases e enzimas envolvidas no metabolismo de

lipídios e carboidratos e reciclagem de nutrientes (Buchanan-Wollaston e Ainsworth, 1997; Jacob-Wilk et al., 1999 e Watanabe et al., 1994). Durante a senescência ocorrem mudanças metabólicas associadas a múltiplas vias bioquímicas (Zhang et al., 2010). Estes genes associados à senescência são detectados não somente nesta fase, mas também em períodos anteriores ao aparecimento dos primeiros sinais visíveis da senescência (Buchanan-Wollaston e Ainsworth, 1997), demonstrando que o processo é iniciado antes do amarelamento das folhas. Geralmente, os genes expressos em folhas verdes, envolvidos na fotossíntese, têm sua expressão reprimida, enquanto um subgrupo de genes associados à senescência (denominados de “SAGs” - *senescence-associated genes*) é induzido (Guo e Gan, 2006). SAGs já foram identificados em diversas espécies de plantas (Gepstein et al., 2003). Em arroz, alguns genes envolvidos em diversas vias metabólicas, como resposta a estresse, degradação de ácidos graxos, metabolismo de aminoácidos, e outros (Lee et al., 2001), foram isolados, caracterizados e associados à senescência.

Alguns fatores de transcrição têm sido relatados regulando os processos na senescência. Dois importantes fatores de transcrição, NAC e WRKY, constituem os maiores grupos de fatores de transcrição modulados na senescência (Guo et al., 2004), já descritos em trigo e *Arabidopsis* (Uauy et al., 2006; Guo e Gan, 2006; Miao et al., 2004). Entretanto, a função biológica e como estes genes atuam na regulação da senescência ainda não é bem entendida.

Os genes da família NAC estão envolvidos no desenvolvimento do meristema, formação de raízes laterais, sinalização de auxinas, defesa e resposta a estresse abiótico (Olsen et al. 2005). *AtNAP* é um fator de transcrição relacionado com a senescência em *Arabidopsis* e seus homólogos de arroz e feijão também são induzidos na senescência foliar (Guo e Gan 2006). Nas plantas APx4s, o gene *OsNAP*, um homólogo do gene *AtNAP*, teve sua expressão analisada e, apesar de não apresentar alta indução nas plantas mais velhas, foi verificada a indução da expressão deste gene em folhas de plantas APx4s jovens, e nas plantas não-transformadas o pico de indução ocorreu em folhas intermediárias. Isto sugere que este gene pode ter sua expressão induzida em uma fase anterior em relação às plantas não-transformadas. O mesmo padrão de indução ocorreu para o gene *OsI2*, sugerindo que o processo de senescência está alterado nas plantas APx4s. O gene *OsNAP* deve controlar o processo de senescência por ativar ou reprimir genes envolvidos na execução da senescência.

O fator de transcrição *AtWRKY53* tem um papel central no controle do processo de senescência foliar, principalmente atuando entre a senescência e a resposta a estresses bióticos e abióticos (Zentgraf et al., 2010). Plantas submetidas a estresses apresentam senescência prematura, o que ocasiona redução na produção e qualidade das culturas. Nas plantas APx4s, o gene *OsWRKY113* teve sua expressão reprimida, em plantas de dois meses, mostrando que houve a modulação de genes relacionados à senescência. Plantas de *Arabidopsis* nocautes para o fator de transcrição *WRKY53* apresentaram atraso na senescência (Zentgraf et al., 2010).

Folhas senescentes possuem aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (Merzlyak e Hendry, 1994), possivelmente pela degradação das macromoléculas. Este aumento de radicais livres pode ser usado como um sinal para promover a senescência (Zimmermann et al., 2006). Os peroxissomos e as ERO geradas nestas organelas são induzidos nos processos de senescência, tanto na induzida como na senescência natural (Pastori & Del Rio, 1994; 1997) e o aumento de ERO induz a conversão metabólica de peroxissomos foliares para glioxissomos na senescência (Palma et al., 2006). A fotorespiração é diminuída durante a senescência foliar, mas enzimas do ciclo do glioxilato são induzidas (Buchanan-Wollaston e Ainsworth, 1997), aumentando a geração de energia na célula. É neste processo que os peroxissomos foliares são transformados em peroxissomos do tipo glioxissomos, ocorrendo também um aumento no número de peroxissomos (Nishimura et al., 1996; Droillard e Paulin, 1990; Pastori e Del Rio, 1997).

Concomitantemente, ocorre a modulação de genes de proteção envolvidos no metabolismo antioxidante (Price et al., 2008). Nos peroxissomos, a atividade da catalase é reduzida, entretanto a enzima SOD tem sua atividade aumentada, o que está de acordo com o aumento de ERO durante o processo de senescência (Pastori e Del Rio, 1994; 1997; Del Rio et al., 1998). Foi sugerido por Ye et al. (2000) que durante a senescência ocorre um decréscimo da atividade de APx, o que ocasiona um aumento de peróxido de hidrogênio nas células, servindo como molécula sinalizadora para a senescência, sendo que em plantas mutantes de *Arabidopsis* com deficiências em produzir ascorbato a senescência é alterada (Barth et al., 2004). Porém, sugere-se que a repressão da atividade de APx seja uma consequência do aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio e não a causa, em que a redução da atividade da enzima catalase seja a responsável pelo aumento de peróxido de hidrogênio nos peroxissomos (Zimmermann et al., 2006). Em ervilha também foi verificada a diminuição da atividade de APx, CAT

e MDHAR em folhas senescentes, assim como de enzimas que participam da fotorespiração, o contrário ocorrendo com enzimas do ciclo do glioxilato, sendo verificada indução da malato sintase (Palma et al., 2006).

Com base nas análises feitas, sugere-se que as isoformas peroxissomais de APx têm seu papel na célula vegetal associado aos papéis desempenhados pelos peroxissomos. Sendo assim, estas enzimas devem ser determinantes nos processos metabólicos relacionados à fotorespiração, transporte de nutrientes e senescência.

DISCUSSÃO GERAL

A agricultura é uma atividade de extrema importância para a economia mundial, sendo uma das principais fontes de riqueza de um país, e em alguns países, a única fonte. Muito se investe na melhoria das técnicas de cultivo e na qualidade dos produtos cultivados, desejando-se sempre obter uma maior produtividade. Entretanto, as culturas estão suscetíveis a todo tipo de estresse, seja ele causado por fatores ambientais, como seca, salinidade, frio, calor, intensidade luminosa e luz UV, ou causado por fatores bióticos, como o ataque de pragas e patógenos, causando grandes perdas na produção.

Objetivando-se melhorar a produtividade e minimizar os problemas fitossanitários nas culturas, que vem causando diminuição da área cultivada em produção e desaceleração do ritmo de novos plantios, o melhoramento genético, através de técnicas biotecnológicas, será cada vez mais utilizado como alternativa viável. Para isto é necessária a identificação de novos genes que possam contribuir de forma positiva para a melhoria das culturas.

O arroz é uma planta de grande importância econômica, além de ser modelo para estudos de genômica em monocotiledôneas, o que torna esta planta ideal para estudos funcionais com genes do sistema antioxidante. O genoma do arroz já foi sequenciado e a anotação do genoma disponibilizou grandes quantidades de dados para pesquisas, permitindo a realização de várias análises de expressão com genes de interesse.

Neste trabalho, foram desenvolvidas plantas transgênicas silenciadas para quatro isoformas de APx de arroz: isoformas citosólicas (*OsAPx1* e *OsAPx2*) e isoformas peroxissomais (*OsAPx3* e *OsAPx4*). O silenciamento pós-transcricional foi obtido através da técnica de RNA de interferência. As diferentes plantas obtidas apresentaram características próprias e fenótipos específicos para cada construção.

As plantas duplamente silenciadas APx1/2s não apresentaram diferenças fenotípicas em relação à planta não-transformada, entretanto o silenciamento de uma única isoforma citosólica causou nanismo e esterilidade. Para investigar quais vias foram ativadas ou reprimidas nas plantas APx1/2s que propiciaram esse mecanismo compensatório, análises de expressão global foram feitas por microarranjo e proteômica. Vários genes e proteínas foram modulados em decorrência da ausência das isoformas citosólicas de APx, conseqüentemente, pelo maior acúmulo de peróxido de hidrogênio nas células. Os principais grupos de genes e proteínas diferencialmente expressos foram

os relacionados à fotossíntese, metabolismo de proteínas, fatores de transcrição e ao estresse oxidativo.

Em relação à fotossíntese, nas plantas APx1/2s não houve alteração nas taxas fotossintéticas. Entretanto, alguns parâmetros foram induzidos, como a fotorespiração e a dissipação do excesso de energia nos fotossistemas, o que está de acordo com os genes e proteínas modulados nestas plantas. Ou seja, a maquinaria fotossintética sofreu modificações para permitir que a planta APx1/2s mantivesse os mesmos níveis de fotossíntese que a planta não-transformada. Em outro trabalho foi verificada a indução da fotorespiração em plantas submetidas a estresse por peróxido de hidrogênio (Wan e Liu, 2008). O sistema antioxidante também foi modulado nas plantas APx1/2s, como verificado nas análises de microarranjo e proteômica, nas análises de atividade das enzimas (Rosa et al., 2010) e análises de expressão gênica (Bonifacio et al., 2011). A expressão e a atividade de enzimas do sistema antioxidante foram alteradas para compensar a falta das APx no citosol, como a indução de SOD (promovendo maior acúmulo de peróxido de hidrogênio), CAT e GPx, enzimas induzidas para detoxificar o peróxido de hidrogênio em excesso. Outros genes e proteínas com funções de síntese e degradação protéica e fatores de transcrição envolvidos no crescimento e desenvolvimento da planta também foram modulados em resposta ao acúmulo de peróxido de hidrogênio. Plantas de *Arabidopsis* com supressão da isoforma APx1 apresentaram colapso do sistema antioxidante cloroplastídico, aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio e oxidação de proteínas (Davletova et al., 2005). Isto demonstra que todo o complexo sistema de defesa existente na planta está interligado com outras vias metabólicas e que, quando este sistema é perturbado, ocorre na célula uma reprogramação visando evitar maiores danos à planta. As plantas APx1/2s parecem estar em um constante estado de estresse brando, aclimatadas a uma nova condição.

As APxs peroxissomais haviam sido previamente caracterizadas e apresentaram diferenças fenotípicas em relação à planta não-transformada, por isso outra abordagem foi dada ao estudo destas plantas. Plantas APx4s têm como características atraso no desenvolvimento da panícula e são mais suscetíveis à senescência. Análises de expressão dos genes que codificam as isoformas peroxissomais de APx mostraram que estes genes são mais expressos em tecidos de folhas, aumentando a expressão em tecidos de folhas mais velhas, corroborando com análises *in silico* em bancos de dados públicos. Os genes também são expressos nas fases de desenvolvimento da panícula, apresentando um pico de expressão no estágio R5, onde se inicia o enchimento dos

grãos. A sequência promotora do gene *OsAPx4* foi expressa em diferentes tecidos da planta, principalmente nas folhas, espiguetas e vasos condutores. Aparentemente, a expressão da isoforma APx4 está relacionada com a função e atividade dos peroxissomos na planta.

Observando o padrão de expressão do gene da isoforma APx4, nota-se que este gene é expresso principalmente no sistema vascular das plantas de arroz. Alguns trabalhos já têm relacionado o acúmulo de ERO na região dos vasos condutores em plantas (Benitez-Alfonso e Jackson, 2009; Benitez-Alfonso et al., 2010). A função das ERO no sistema vascular ainda não é bem conhecida, mas sabe-se que o acúmulo de ERO próximo à região dos vasos condutores causa o aumento da síntese de calose e o fechamento dos plasmodesmos, diminuindo, assim, o transporte de nutrientes entre as células (transporte simplástico) e ocasionando redução do metabolismo de amidos. Mudanças no transporte de plasmodesmos e a produção de ERO têm sido relatadas em uma variedade de processos que ocorrem ao longo do desenvolvimento da planta e também em resposta a estresses (Benitez-Alfonso et al., 2010). Como a comunicação via plasmodesmos está relacionada com a deposição de calose, uma ligação entre a homeostase redox da célula e a síntese de calose tem sido estabelecida. A regulação redox tem impacto sobre a deposição de calose nas anteras das flores (Xing e Zachgo, 2008), assim como em algodão foi verificado que o alongamento das fibras é co-regulada por ERO e calose, correlacionada com mudanças na permeabilidade dos plasmodesmos (Ruan et al., 2004) e um notável aumento de expressão de APx (Li et al., 2007). Sendo assim, a presença de enzimas participantes do sistema antioxidante, como a APx, no sistema condutor das plantas é importante para proteger os vasos condutores de algum estresse ou injúria. Quando as plantas sofrem algum dano, ocorre aumento de ERO, com remodelamento dos canais condutores, indução da síntese de calose e fechamento de plasmodesmos, para evitar a perda de nutrientes, principalmente sacarose (Benitez-Alfonso e Jackson, 2009; Benitez-Alfonso et al., 2010).

Entretanto, a proteção dos vasos condutores também pode estar relacionada com outro processo do desenvolvimento vegetal, a senescência. Acredita-se que as APxs tenham um papel importante na senescência, protegendo do peróxido de hidrogênio outras proteínas responsáveis por translocar os nutrientes de folhas senescentes para as folhas verdes. O transporte dos nutrientes é realizado pelo floema e na senescência esse transporte é reduzido, indicando que a deposição de calose nos plasmodesmos bloqueia o transporte simplástico como consequência da redução da capacidade antioxidante e o

aumento do acúmulo de ERO (Jongebloed et al., 2004). Por ser a senescência um processo regulado por ERO, é importante a presença de APxs peroxissomais neste processo. Além disto, os peroxissomos também são organelas relacionadas com a senescência. Em folhas maduras, ocorre um aumento do número de peroxissomos nas células e os peroxissomos foliares, com função ligada à fotorespiração, sofrem modificações e são transformados em glioxissomos (gerontossomos), onde a degradação de macromoléculas é aumentada.

A função de cada isoforma de APx em plantas ainda não está bem estabelecida, mas acredita-se que esteja relacionada ao compartimento celular em que está localizada. As isoformas citosólicas parecem estar mais relacionadas com a sinalização do estresse causado pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio. O silenciamento de uma APx citosólica causou o colapso da atividade fotossintética e o acúmulo de peróxido de hidrogênio nas células (Davletova et al., 2005) e a expressão desta isoforma também foi induzida em resposta a estresse de luz (Shigeoka et al., 2002). Entretanto, as isoformas cloroplastídicas não foram induzidas no estresse luminoso, sugerindo-se que o sistema antioxidante basal do cloroplasto tenha capacidade de controlar o acúmulo de ERO e que o aumento de APx citosólica seja um sinal sistêmico, envolvendo a sinalização cloroplasto-núcleo (Karpinski et al., 1997; Rodermel, 2001; Mullineaux and Karpinski, 2002). A localização de APx citosólica já foi detectada no núcleo das células vegetais em arroz (Caverzan, dados não publicados). Sugere-se que a atividade das APxs citosólicas esteja relacionada com a função de proteção das organelas celulares do efeito tóxico do peróxido de hidrogênio, servindo como barreira protetora, principalmente do cloroplasto, para evitar danos ao processo fotossintético (Davletova et al., 2005). Ou talvez as isoformas citosólicas sejam enzimas responsáveis por detoxificar o peróxido de hidrogênio que ultrapassa as membranas das organelas produtoras de ERO e circulam no citosol e, com maior importância, teriam a função de sinalizar ao núcleo o acúmulo de peróxido de hidrogênio na célula, ativando e reprimindo rotas de resposta e defesa. Conforme análises de expressão global das plantas APx1/2s, os genes modulados pelo silenciamento das isoformas citosólicas em arroz são genes que responderam a outros estresses causados por acúmulo de peróxido de hidrogênio (Wan e Liu, 2008; Yan et al., 2006; Desikan et al., 2001).

As isoformas peroxissomais de APx tem sua função relacionada com o peroxissomo, envolvidas na proteção desta organela em processos como a fotorespiração e senescência. A atividade de APx peroxissomais já foi relatada em

outras espécies de plantas. Em ervilha, a APx peroxissomal apresenta redução da atividade em folhas senescentes (Palma et al., 2006), além de atuar como enzima de defesa em resposta a estresses (Nito et al., 2001; Kjaersgaard et al., 2011; Kavitha et al., 2008).

Para identificar precisamente as funções das APxs no metabolismo celular das plantas e o papel dessas enzimas no metabolismo antioxidante, futuros estudos devem ser realizados. Até o atual momento, sabe-se que estas enzimas são importantes para a manutenção da homeostase redox celular e que atuam na defesa da planta frente a diversos estresses bióticos e abióticos. Estes genes despertam um grande interesse, pois com as mudanças climáticas ocorrendo em ritmo acelerado, as culturas em todo o mundo estarão cada vez mais suscetíveis a estresses causados por fatores ambientais. Sendo assim, a busca de novos genes de defesa, que poderão conferir à planta características melhoradas para o cultivo, são de extrema importância para a continuidade das atividades agrícolas em todos os países.

Sendo assim, é necessário o conhecimento mais aprofundado sobre a expressão, atividade, função e inter-relações dos genes de defesa nas plantas. Nesta tese de doutorado foram feitas análises genômicas, fisiológicas e anatômicas de plantas transformadas apresentando o silenciamento de quatro isoformas da enzima ascorbato peroxidase em arroz, visando contribuir para um melhor entendimento do papel das APx no metabolismo antioxidante e os processos em que estas enzimas estão envolvidas. Espera-se que, no futuro, estes genes sejam usados como ferramentas para o melhoramento genético de cultivares. Como perspectivas, temos: a) análise dos peroxissomos nas plantas APx4s, em relação ao número de organelas e tipo, comparando com plantas NT; b) análise da expressão do gene *OsAPx4* no meristema de inflorescência de plantas de arroz; c) análises morfológicas das plantas APx4s, em comparação com plantas NT; d) obtenção de plantas silenciadas para as duas isoformas peroxissomais de APx (APx3/APx4) simultaneamente; e) obtenção de plantas silenciadas e superexpressando o gene *OsAPx3*; f) caracterização do gene *OsAPx3* como potencial gene marcador de senescência.

O conjunto de dados reunidos neste trabalho é mais um passo no entendimento da regulação e funcionamento do metabolismo antioxidante das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abebe T, Skadsen R, Kaeppler H: **Cloning and identification of highly expressed genes in barley lemm a and palea.** *Crop Sci* 2004, **44**:942–950.
- Agrawal GK, Jwa NS, Iwahashi H, Rakwal R: **Importance of ascorbate peroxidases OsAPX1 and OsAPX2 in the rice pathogen response pathways and growth and reproduction revealed by their transcriptional profiling.** *Gene* 2003, **322**:93-103.
- Allen RD, Webb RP, Schake SA: **Use of transgenic plants to study antioxidant defenses.** *Free Radic Biol Med* 1997, **23**(3):473-479.
- Apezato-da-Gloria B, Carmello-Gruerreiro S: **Anatomia Vegetal**, 2 edn. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2006.
- Asada K: **THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons.** *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1999, **50**:601-639.
- Barth C, Moeder W, Klessig DF, Conklin PL: **The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient Arabidopsis mutant vitamin c-1.** *Plant Physiol* 2004, **134**(4):1784-1792.
- Bartosz G: **Oxidative stress in plants.** *Oxidative stress in plants* 1997, **19**:47-64.
- Benitez-Alfonso Y, Jackson D, Maule A: **Redox regulation of intercellular transport.** *Protoplasma* 2010, **248**(1):131-140.
- Benitez-Alfonso Y, Jackson D: **Redox homeostasis regulates plasmodesmal communication in Arabidopsis meristems.** *Plant Signal Behav* 2009, **4**(7):655-659.
- Bonifacio A, Martins MD, Ribeiro CW, Fontenele AV, Carvalho FE, Margis-Pinheiro M, Silveira JA: **Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress.** *Plant Cell Environ* 2011.
- Bozso Z, Ott PG, Szamari A, Zelleng A, Varga G, Besenyi E: **Early detection of bacterium-induced basal resistance in tobacco leaves with diamminobenzidine and dichlorofluorescein diacetate.** *J Phytopathol* 2005, **153**:596–607.

- Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ: **ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis.** *Plant J* 2006, **45**(1):113-122.
- Buchanan-Wollaston V, Ainsworth C: **Leaf senescence in Brassica napus: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation.** *Plant Mol Biol* 1997, **33**(5):821-834.
- Bunkelmann JR, Trelease RN: **Ascorbate peroxidase. A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes.** *Plant Physiol* 1996, **110**(2):589-598.
- Chun SS, Vatem DA, Lin YT, Shetty K: **Phenolic antioxidants from clonal oregano (Origanum vulgare) with antimicrobial activity against Helicobacter pylori.** *Process Biochem* 2005, **40**:809-816.
- Corpas FJ, Barroso JB, del Rio LA: **Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells.** *Trends Plant Sci* 2001, **6**(4):145-150.
- Counce PA, Keisling TC, Mitchell AJ: **A Uniform, Objective, and Adaptive System for Expressing Rice Development.** *Crop Science* 2000, **40**:436-443.
- Dalton TP, Shertzer HG, Puga A: **Regulation of gene expression by reactive oxygen.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999, **39**:67-101.
- Davidse G, Sousa Sánchez M, Chater A: **Alismataceae a Cyperaceae.** In: *Flora Mesoamericana*. 1994: 1-543.
- Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K, Mittler R: **Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis.** *Plant Cell* 2005, **17**(1):268-281
- de Pinto MC, Paradiso A, Leonetti P, De Gara L: **Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death.** *Plant J* 2006, **48**(5):784-795.
- Del Rio LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gomez M, Barroso JB: **Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes.** *J Exp Bot* 2002, **53**(372):1255-1272.

- Del Rio LA, Pastori GM, Palma JM, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jimenez A, Lopez-Huertas E, Hernandez JA: **The activated oxygen role of peroxisomes in senescence.** *Plant Physiol* 1998, **116**(4):1195-1200.
- Del Rio LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB: **Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling.** *Plant Physiol* 2006, **141**(2):330-335.
- Dempsey D, Klessig D: **Signals in plant disease resistance.** *Bull Inst P asteur* 1995, **93**:167-186.
- Desikan R, S AH-M, Hancock JT, Neill SJ: **Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress.** *Plant Physiol* 2001, **127**(1):159-172.
- Dhaliwhal GS, Arora R: **Environmental Stress in crop plants:** Ajay Verma Commonwealth Publishers; 1999.
- Dionisio-Sese ML, Tobita S: **Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress.** *Plant Sci* 1998, **135**:1-9.
- Droillard MJ, Paulin A: **Isozymes of Superoxide Dismutase in Mitochondria and Peroxisomes Isolated from Petals of Carnation (*Dianthus caryophyllus*) during Senescence.** *Plant Physiol* 1990, **94**(3):1187-1192.
- Embrapa – www.embrapa.br.
- Fernandes ML: **Nutrição Mineral de Plantas.** Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo; 2006.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD *et al*: **Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth.** *Nature* 2003, **422**(6930):442-446.
- Foyer CH, Noctor G: **Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub.** *Plant Physiol* 2011, **155**(1):2-18.
- Foyer CH, Noctor G: **Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses.** *Plant Cell* 2005, **17**(7):1866-1875.
- Fry SC: **Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals.** *Biochem J* 1998, **332** (Pt 2):507-515.
- Fryer MJ, Ball L, Oxborough K, Karpinski S, Mullineaux PM, Baker NR: **Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of Arabidopsis leaves.** *Plant J* 2003, **33**(4):691-705.

- Gadjev I, Vanderauwera S, Gechev TS, Laloi C, Minkov IN, Shulaev V, Apel K, Inze D, Mittler R, Van Breusegem F: **Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in Arabidopsis**. *Plant Physiol* 2006, **141**(2):436-445.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K: **Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells**. *Exp Cell Res* 1968, **50**(1):151-158.
- Gao X, Liang W, Yin C, Ji S, Wang H, Su X, Guo C, Kong H, Xue H, Zhang D: **The SEPALLATA-like gene OsMADS34 is required for rice inflorescence and spikelet development**. *Plant Physiol* 2010, **153**(2):728-740.
- Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J: **Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures**. *Plant Growth Regulation* 2002, **37**:263-285.
- Gay C, Collins J, Gebicki JM: **Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex**. *Anal Biochem* 1999, **273**(2):149-155.
- Gepstein S, Sabehi G, Carp MJ, Hajouj T, Neshar MF, Yariv I, Dor C, Bassani M: **Large-scale identification of leaf senescence-associated genes**. *Plant J* 2003, **36**(5):629-642.
- Gill SS, Tuteja N: **Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants**. *Plant Physiol Biochem* 2010, **48**(12):909-930.
- Gille G, Sigler K: **Oxidative stress and living cells**. *Folia Microbiol (Praha)* 1995, **40**(2):131-152.
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H *et al*: **A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica)**. *Science* 2002, **296**(5565):92-100.
- Gratao PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA: **Making the life of heavy metal stressed plants a little easier**. *Funct Plant Biol* 2005, **32**:481 - 494.
- Greene R: **Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants**; 2002.
- Guo Y, Cai Z, Gan S: **Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence**. *Plant Cell Environ* 2004, **27**:521-549.
- Guo Y, Gan S: **AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence**. *Plant J* 2006, **46**(4):601-612.
- Halliwell B, Gutteridge JM: **Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease**. *Biochem J* 1984, **219**(1):1-14.

- Halliwell B: **Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life.** *Plant Physiol* 2006, **141**(2):312-322.
- Havir EA, McHale NA: **Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves.** *Plant Physiol* 1987, **84**(2):450-455.
- He H, Serraj R, Yang Q: **Changes in OsXTH gene expression, ABA content, and peduncle elongation in rice subjected to drought at the reproductive stage.** *Acta Physiol Plant* 2009, **31**:749–756.
- Henrissat B, Saloheimo M, Lavaitte S, Knowles JK: **Structural homology among the peroxidase enzyme family revealed by hydrophobic cluster analysis.** *Proteins* 1990, **8**(3):251-257.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T: **Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA.** *Plant J* 1994, **6**(2):271-282.
- Ikeda K, Ito M, Nagasawa N, Kyojuka J, Nagato Y: **Rice ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1, encoding an F-box protein, regulates meristem fate.** *Plant J* 2007, **51**(6):1030-1040.
- Ikeda K, Nagasawa N, Nagato Y: **ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1 temporally regulates meristem identity in rice.** *Dev Biol* 2005, **282**(2):349-360.
- Ikeda-Kawakatsu K, Yasuno N, Oikawa T, Iida S, Nagato Y, Maekawa M, Kyojuka J: **Expression level of ABERRANT PANICLE ORGANIZATION1 determines rice inflorescence form through control of cell proliferation in the meristem.** *Plant Physiol* 2009, **150**(2):736-747.
- Ishikawa T, Morimoto Y, Madhusudhan R, Sawa Y, Shibata H, Yabuta Y, Nishizawa A, Shigeoka S: **Acclimation to diverse environmental stresses caused by a suppression of cytosolic ascorbate peroxidase in tobacco BY-2 cells.** *Plant Cell Physiol* 2005, **46**(8):1264-1271.
- Ishikawa T, Yoshimura K, Sakai K, Tamoi M, Takeda T, Shigeoka S: **Molecular characterization and physiological role of a glyoxysome-bound ascorbate peroxidase from spinach.** *Plant Cell Physiol* 1998, **39**(1):23-34.
- Jackson D: **In-situ hybridisation in plants. Molecular Plant Pathology: A Practical Approach:** Oxford University Press; 1991.

- Jacob-Wilk D, Holland D, Goldschmidt EE, Riov J, Eyal Y: **Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the Chlase1 gene from ethylene-treated Citrus fruit and its regulation during development.** *Plant J* 1999, **20**(6):653-661.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW: **GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.** *EMBO J* 1987, **6**(13):3901-3907.
- Ji X, Raveendran M, Oane R, Ismail A, Lafitte R, Bruskiwich R, Cheng S, Bennett J: **Tissue-specific expression and drought responsiveness of cell-wall invertase genes of rice at flowering.** *Plant Molecular Biology* 2005, **59**: 59.
- Jimenez A, Hernandez JA, Pastori G, del Rio LA, Sevilla F: **Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves.** *Plant Physiol* 1998, **118**(4):1327-1335.
- Jongebloed U, Szederkenyi J, Hartig K, Schobert C, Komor E: **Sequence of morphological and physiological events during natural ageing and senescence of a castor bean leaf: sieve tube occlusion and carbohydrate back-up precede chlorophyll degradation.** *Physiol Plant* 2004, **120**(2):338-346.
- Kang K, Kim YS, Park S, Back K: **Senescence-induced serotonin biosynthesis and its role in delaying senescence in rice leaves.** *Plant Physiol* 2009, **150**(3):1380-1393.
- Karimi M, De Meyer B, Hilson P: **Modular cloning in plant cells.** *Trends Plant Sci* 2005, **10**(3):103-105.
- Karpinski S, Escobar C, Karpinska B, Creissen G, Mullineaux PM: **Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in Arabidopsis during excess light stress.** *Plant Cell* 1997, **9**(4):627-640.
- Kavitha K, Venkataraman G, Parida A: **An oxidative and salinity stress induced peroxisomal ascorbate peroxidase from Avicennia marina: molecular and functional characterization.** *Plant Physiol Biochem* 2008, **46**(8-9):794-804.
- Kjaersgaard T, Jensen MK, Christiansen MW, Gregersen P, Kragelund BB, Skriver K: **Senescence-associated barley NAC (NAM, ATAF1,2, CUC) transcription factor interacts with radical-induced cell death 1 through a disordered regulatory domain.** *J Biol Chem* 2011, **286**(41):35418-35429.

- Kobayashi K, Maekawa M, Miyao A, Hirochika H, Kyojuka J: **PANICLE PHYTOMER2 (PAP2), encoding a SEPALLATA subfamily MADS-box protein, positively controls spikelet meristem identity in rice.** *Plant Cell Physiol* 2010, **51**(1):47-57.
- Komatsu M, Maekawa M, Shimamoto K, Kyojuka J: **The LAX1 and FRIZZY PANICLE 2 genes determine the inflorescence architecture of rice by controlling rachis-branch and spikelet development.** *Dev Biol* 2001, **231**(2):364-373.
- Koussevitzky S, Suzuki N, Huntington S, Armijo L, Sha W, Cortes D, Shulaev V, Mittler R: **Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of Arabidopsis thaliana to stress combination.** *J Biol Chem* 2008, **283**(49):34197-34203.
- Kwak JM, Nguyen V, Schroeder JI: **The role of reactive oxygen species in hormonal responses.** *Plant Physiol* 2006, **141**(2):323-329.
- Langer R: **How Grasses Grow.** London, 1979, p. 1-60.
- Larcher W: **Ecofisiologia vegetal.** São Carlos, SP: RiMa; 2004.
- Lazarow PB, Fujiki Y: **Biogenesis of peroxisomes.** *Annu Rev Cell Biol* 1985, **1**:489-530.
- Lee HD, Kim YS, Lee CB: **The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (Oryza sativa L.).** *J Plant Physiol* 2001a, **158**:737-745.
- Lee RH, Wang CH, Huang LT, Chen SC: **Leaf senescence in rice plants: cloning and characterization of senescence up-regulated genes.** *J Exp Bot* 2001, **52**(358):1117-1121.
- Li HB, Qin YM, Pang Y, Song WQ, Mei WQ, Zhu YX: **A cotton ascorbate peroxidase is involved in hydrogen peroxide homeostasis during fibre cell development.** *New Phytol* 2007, **175**(3):462-471.
- Li M, Tang D, Wang K, Wu X, Lu L, Yu H, Gu M, Yan C, Cheng Z: **Mutations in the F-box gene LARGER PANICLE improve the panicle architecture and enhance the grain yield in rice.** *Plant Biotechnol J* 2011, **9**(9):1002-1013.
- Li N, Zhang DS, Liu HS, Yin CS, Li XX, Liang WQ, Yuan Z, Xu B, Chu HW, Wang J *et al*: **The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development.** *Plant Cell* 2006, **18**(11):2999-3014.

- Lichtenthaler HK, Wellburn AR: **Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents.** *Biochemical Society Transactions* 1983, **11**:591-592.
- Lichtenthaler HK: **El estrés y la medida del estrés en plantas.** In: *La Ecofisiología Vegetal – Una ciencia de síntesis.* Edited by Reigosa MJ, Pedrol N, Sánchez A. Madrid: Thomson; 2004: p.1017-1054.
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG: **Leaf senescence.** *Annu Rev Plant Biol* 2007, **58**:115-136.
- Lin CC, Kao CH: **Effects of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves.** *Plant Growth Regulation* 2000, **30**:151-155.
- Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
- Lu Z, Liu D, Liu S: **Two rice cytosolic ascorbate peroxidases differentially improve salt tolerance in transgenic Arabidopsis.** *Plant Cell Rep* 2007, **26**(10):1909-1917.
- Luna CM, Gonzalez CA, Trippi VS: **Oxidative Damage Caused by an Excess of Copper in Oat Leaves.** *Plant Cell Physiol* 1994, **35**:11 -15.
- Mandelman D, Schwarz FP, Li H, Poulos TL: **The role of quaternary interactions on the stability and activity of ascorbate peroxidase.** *Protein Sci* 1998, **7**(10):2089-2098.
- Mano S, Nishimura M: **Plant peroxisomes.** *Vitam Horm* 2005, **72**:111-154.
- Mazen AMA: **Accumulation of four metals in tissues of Corchorus olitorius and possible mechanisms of their tolerance.** *Biologia Plantarum* 2004, **48**:267-272.
- Menezes-Benavente L, Teixeira FK, Kamei CL, Margis-Pinheiro M: **Salt stress induces expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian indica rice (Oryza sativa L.).** *Plant Sci* 2004, **166**:323-331.
- Merzlyak M, Hendry G: **Free-radical metabolism, pigment degradation and lipid peroxidation in leaves during senescence.** *Proc R Soc Edinburgh B* 1994, **102**:459–471.
- Miao Y, Laun T, Zimmermann P, Zentgraf U: **Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in Arabidopsis.** *Plant Mol Biol* 2004, **55**(6):853-867.

- Miki D, Shimamoto K: **Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice.** *Plant Cell Physiol* 2004, **45**(4):490-495.
- Miller AR: **Oxidation of cell wall polysaccharides by hydrogen peroxide: a potential mechanism for cell wall breakdown in plants.** *Biochem Biophys Res Commun* 1986, **141**(1):238-244.
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R: **Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses.** *Plant Cell Environ* 2010, **33**(4):453-467.
- Miller G, Suzuki N, Rizhsky L, Hegie A, Koussevitzky S, Mittler R: **Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses.** *Plant Physiol* 2007, **144**(4):1777-1785.
- Mittler R, Feng X, Cohen M: **Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco.** *Plant Cell* 1998, **10**(3):461-473.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F: **Reactive oxygen gene network of plants.** *Trends Plant Sci* 2004, **9**(10):490-498.
- Mittler R, Zilinskas BA: **Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase.** *Plant Physiol* 1991, **97**(3):962-968.
- Mittler R: **Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance.** *Trends Plant Sci* 2002, **7**(9):405-410.
- Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M: **Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*.** *Plant Cell Environ* 2003, **26**(6):845-856.
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A: **Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants.** *Annu Rev Plant Biol* 2007, **58**:459-481.
- Moore G, Devos KM, Wang Z, Gale MD: **Cereal genome evolution. Grasses, line up and form a circle.** *Curr Biol* 1995, **5**(7):737-739.
- Mullen RT, Trelease RN: **The ER-peroxisome connection in plants: development of the "ER semi-autonomous peroxisome maturation and replication" model for plant peroxisome biogenesis.** *Biochim Biophys Acta* 2006, **1763**(12):1655-1668.

- Mullineaux P, Karpinski S: **Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast.** *Curr Opin Plant Biol* 2002, **5**(1):43-48.
- Murashige T, Skoog F: **A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** *Physiologia Plantarum* 1962, **15**:473-497.
- Muthurajan R, Shobbar ZS, Jagadish SV, Bruskiewich R, Ismail A, Leung H, Bennett J: **Physiological and proteomic responses of rice peduncles to drought stress.** *Mol Biotechnol* 2011, **48**(2):173-182.
- Nakagawa M, Shimamoto K, Kyojuka J: **Overexpression of RCN1 and RCN2, rice TERMINAL FLOWER 1/CENTRORADIALIS homologs, confers delay of phase transition and altered panicle morphology in rice.** *Plant J* 2002, **29**(6):743-750.
- Nakano Y, Asada K: **Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts.** *Plant and Cell Physiology* 1981, **22**:867-880.
- Narendra S, Venkataramani S, Shen G, Wang J, Pasapula V, Lin Y, Korniyev D, Holaday AS, Zhang H: **The Arabidopsis ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for Arabidopsis growth and development.** *J Exp Bot* 2006, **57**(12):3033-3042.
- Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, Jaquot JP: **Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria.** *Physiol Plant* 2007, **129**:185-195.
- Neill S, Desikan R, Hancock J: **Hydrogen peroxide signaling** *Current Opinion in Plant Biology* 2002, **5**:388–395.
- Nilsen ET, Orcutt DM: **The Physiology of Plants under Stress – Abiotic factors.** New York: John Wiley and Sons; 1996.
- Nishimura M, Hayashi M, Kato A, Yamaguchi K, Mano S: **Functional transformation of microbodies in higher plant cells.** *Cell Struct Funct* 1996, **21**(5):387-393.
- Nito K, Yamaguchi K, Kondo M, Hayashi M, Nishimura M: **Pumpkin peroxisomal ascorbate peroxidase is localized on peroxisomal membranes and unknown membranous structures.** *Plant Cell Physiol* 2001, **42**(1):20-27.
- Noctor G, Foyer CH: **Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control.** *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998, **49**:249-279.
- Nyathi Y, Baker A: **Plant peroxisomes as a source of signalling molecules.** *Biochim Biophys Acta* 2006, **1763**:1478–1495.

- Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K: **NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse.** *Trends Plant Sci* 2005, **10**(2):79-87.
- Olsen LJ: **The surprising complexity of peroxisome biogenesis.** *Plant Mol Biol* 1998, **38**(1-2):163-189.
- Palma JM, Jimenez A, Sandalio LM, Corpas FJ, Lundqvist M, Gomez M, Sevilla F, del Rio LA: **Antioxidative enzymes from chloroplasts, mitochondria, and peroxisomes during leaf senescence of nodulated pea plants.** *J Exp Bot* 2006, **57**(8):1747-1758.
- Panchuk, II, Volkov RA, Schoffl F: **Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in Arabidopsis.** *Plant Physiol* 2002, **129**(2):838-853.
- Park SH, Yi N, Kim YS, Jeong MH, Bang SW, Choi YD, Kim JK: **Analysis of five novel putative constitutive gene promoters in transgenic rice plants.** *J Exp Bot* 2010, **61**(9):2459-2467.
- Pastori GM, del Río LA: **An activated-oxygen-mediated role for peroxisomes in the mechanism of senescence of *Pisum sativum* L. leaves.** *Planta* 1994, **193**:385–391.
- Pastori GM, Del Rio LA: **Natural Senescence of Pea Leaves (An Activated Oxygen-Mediated Function for Peroxisomes).** *Plant Physiol* 1997, **113**(2):411-418.
- Patterson WR, Poulos TL: **Crystal structure of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase.** *Biochemistry* 1995, **34**(13):4331-4341.
- Peng CL, Ou ZY, Liu N, Lin GZ: **Response to high temperature in flag leaves of super high-yielding rice Pei'ai 64S/E32 and Liangyoupeijiu.** *Rice Sci* 2005, **12**:179-186.
- Pignocchi C, Foyer CH: **Apoplasmic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling.** *Curr Opin Plant Biol* 2003, **6**(4):379-389.
- Pnueli L, Liang H, Rozenberg M, Mittler R: **Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient Arabidopsis plants.** *Plant J* 2003, **34**(2):187-203.
- Prasad K, Parameswaran S, Vijayraghavan U: **OsMADS1, a rice MADS-box factor, controls differentiation of specific cell types in the lemma and palea and is an early-acting regulator of inner floral organs.** *Plant J* 2005, **43**(6):915-928.

- Price AM, Aros Orellana DF, Salleh FM, Stevens R, Acock R, Buchanan-Wollaston V, Stead AD, Rogers HJ: **A comparison of leaf and petal senescence in wallflower reveals common and distinct patterns of gene expression and physiology.** *Plant Physiol* 2008, **147**(4):1898-1912.
- Quan LJ, Zhang B, Shi WW, Li HY: **Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network.** *J Integr Plant Biol* 2008, **50**(1):2-18.
- Queval G, Issakidis-Bourguet E, Hoeberichts FA, Vandorpe M, Gakiere B, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Van Breusegem F, Noctor G: **Conditional oxidative stress responses in the Arabidopsis photorespiratory mutant cat2 demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death.** *Plant J* 2007, **52**(4):640-657.
- Raven EL: **Understanding functional diversity and substrate specificity in haem peroxidases: what can we learn from ascorbate peroxidase?** *Nat Prod Rep* 2003, **20**(4):367-381.
- Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr JE, Rodermel S, Inze D, Mittler R: **Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase.** *Plant J* 2002, **32**(3):329-342.
- Rizhsky L, Liang H, Mittler R: **The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco.** *Plant Physiol* 2002b, **130**(3):1143-1151.
- Rodermel S: **Pathways of plastid-to-nucleus signaling.** *Trends Plant Sci* 2001, **6**(10):471-478.
- Rodriguez AA, Grunberg KA, Taleisnik EL: **Reactive oxygen species in the elongation zone of maize leaves are necessary for leaf extension.** *Plant Physiol* 2002, **129**(4):1627-1632.
- Rosa S: **Caracterização funcional das isoformas citosólicas e peroxissomais de ascorbato peroxidase em arroz (*Oryza sativa* L.).** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.
- Rosa SB, Caverzan A, Teixeira FK, Lazzarotto F, Silveira JA, Ferreira-Silva SL, Abreu-Neto J, Margis R, Margis-Pinheiro M: **Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice.** *Phytochemistry* 2010, **71**(5-6):548-558.

- Rossel JB, Walter PB, Hendrickson L, Chow WS, Poole A, Mullineaux PM, Pogson BJ: **A mutation affecting ASCORBATE PEROXIDASE 2 gene expression reveals a link between responses to high light and drought tolerance.** *Plant Cell Environ* 2006, **29**(2):269-281.
- Rosso D, Ivanov AG, Fu A, Geisler-Lee J, Hendrickson L, Geisler M, Stewart G, Krol M, Hurry V, Rodermel SR *et al*: **IMMUTANS does not act as a stress-induced safety valve in the protection of the photosynthetic apparatus of Arabidopsis during steady-state photosynthesis.** *Plant Physiol* 2006, **142**(2):574-585.
- Ruan YL, Xu SM, White R, Furbank RT: **Genotypic and developmental evidence for the role of plasmodesmatal regulation in cotton fiber elongation mediated by callose turnover.** *Plant Physiol* 2004, **136**(4):4104-4113.
- Sakamoto T, Matsuoka M: **Identifying and exploiting grain yield genes in rice.** *Curr Opin Plant Biol* 2008, **11**(2):209-214.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, 2 edn. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1989.
- Sato Y, Murakami T, Funatsuki H, Matsuba S, Saruyama H, Tanida M: **Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings.** *J Exp Bot* 2001, **52**(354):145-151.
- Scandalios JG: **The rise of ROS.** *Trends Biochem Sci* 2002, **27**(9):483-486.
- Schopfer P: **Histochemical Demonstration and Localization of H₂O₂ in Organs of Higher Plants by Tissue Printing on Nitrocellulose Paper.** *Plant Physiol* 1994, **104**(4):1269-1275.
- Schraudner M, Moeder W, Wiese C, Van Camp W, Inze D, Langebartels C, Sandermann H: **Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3.** *Plant Journal* 1998, **16**.
- Schutzendubel A, Polle A: **Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization.** *J Exp Bot* 2002, **53**(372):1351-1365.
- Schweikert C, Liskay A, Schopfer P: **Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxyl radicals.** *Phytochemistry* 2000, **53**(5):565-570.
- Shao HB, Guo QJ, Chu LY, Zhao XN, Su ZL, Hu YC, Cheng JF: **Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress.** *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007, **54**(1):37-45.

- Sharma P, Dubey RS: **Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum.** *Plant Cell Rep* 2007, **26**(11):2027-2038.
- Sharp KH, Mewies M, Moody PC, Raven EL: **Crystal structure of the ascorbate peroxidase-ascorbate complex.** *Nat Struct Biol* 2003, **10**(4):303-307.
- Shi F, Yamamoto R, Shimamura S, Hiraga S, Nakayama N, Nakamura T, Yukawa K, Hachinohe M, Matsumoto H, Komatsu S: **Cytosolic ascorbate peroxidase 2 (cAPX 2) is involved in the soybean response to flooding.** *Phytochemistry* 2008, **69**(6):1295-1303.
- Shi WM, Muramoto Y, Ueda A, Takabe T: **Cloning of peroxisomal ascorbate peroxidase gene from barley and enhanced thermotolerance by overexpressing in *Arabidopsis thaliana*.** *Gene* 2001, **273**(1):23-27.
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K: **Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes.** *J Exp Bot* 2002, **53**(372):1305-1319.
- Sivakumar P, Sharmila P, Pardha Saradhi P: **Proline alleviates salt-stress-induced enhancement in ribulose-1, 5-bisphosphate oxygenase activity.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **279**(2):512-515.
- Slesak I, Libik M, Karpinska B, Karpinski S, Miszalski Z: **The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses.** *Acta Biochim Pol* 2007, **54**(1):39-50.
- Soares SE: **Ácidos fenólicos como antioxidantes.** *Nutrition Reviews* 2002, **15** 71-81.
- Swanson S, Gilroy S: **ROS in plant development.** *Physiol Plant* 2010, **138**(4):384-392.
- Tang L, Kwon SY, Kim SH, Kim JS, Choi JS, Cho KY, Sung CK, Kwak SS, Lee HS: **Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature.** *Plant Cell Rep* 2006, **25**(12):1380-1386.
- Tarantino D, Vannini C, Bracale M, Campa M, Soave C, Murgia I: **Antisense reduction of thylakoidal ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* enhances paraquat-induced photooxidative stress and nitric oxide-induced cell death.** *Planta* 2005, **221**(6):757-765.
- Teixeira F, Menezes-Benavente L, Galvão V, Margis-Pinheiro M: **Multigene families encode the major enzymes of antioxidant metabolism in *Eucalyptus grandis* L.** *Genetics and Molecular Biology* 2005, **28**:529-538.

- Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Margis R, Margis-Pinheiro M: **Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome.** *J Mol Evol* 2004, **59**(6):761-770.
- Terao T, Nagata K, Morino K, Hirose T: **A gene controlling the number of primary rachis branches also controls the vascular bundle formation and hence is responsible to increase the harvest index and grain yield in rice.** *Theor Appl Genet* 2010, **120**(5):875-893.
- Terasaka K, Blakeslee JJ, Titapiwatanakun B, Peer WA, Bandyopadhyay A, Makam SN, Lee OR, Richards EL, Murphy AS, Sato F *et al*: **PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in Arabidopsis thaliana roots.** *Plant Cell* 2005, **17**(11):2922-2939.
- Torres MA, Jones JD, Dangl JL: **Reactive oxygen species signaling in response to pathogens.** *Plant Physiol* 2006, **141**(2):373-378.
- Tsugane K, Kobayashi K, Niwa Y, Ohba Y, Wada K, Kobayashi H: **A Recessive Arabidopsis Mutant That Grows Photoautotrophically under Salt Stress Shows Enhanced Active Oxygen Detoxification.** *The Plant Cell* 1999, **11**:1195-1206.
- Uauy C, Distelfeld A, Fahima T, Blechl A, Dubcovsky J: **A NAC Gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat.** *Science* 2006, **314**(5803):1298-1301.
- Vacca RA, de Pinto MC, Valenti D, Passarella S, Marra E, De Gara L: **Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells.** *Plant Physiol* 2004, **134**(3):1100-1112.
- Van Bel A: **Strategies of phloem loading.** *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1993, **44**:253-281.
- Van Rossum M, Alberda M, van der Plas L: **Role of oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation.** *Plant Science* 1997, **130**:207-216.
- Vandenabeele S, Van Der Kelen K, Dat J, Gadjev I, Boonefaes T, Morsa S, Rottiers P, Slooten L, Van Montagu M, Zabeau M *et al*: **A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(26):16113-16118.

- Vranova E, Inze D, Van Breusegem F: **Signal transduction during oxidative stress.** *J Exp Bot* 2002, **53**(372):1227-1236.
- Wada K, Tada T, Nakamura Y, Yabuta Y, Yoshimura K, Takeda T, Shigeoka S, Nishimura K: **Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of chloroplastic ascorbate peroxidase of tobacco plants.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2002, **58**(Pt 3):559-561.
- Wan XY, Liu JY: **Comparative proteomics analysis reveals an intimate protein network provoked by hydrogen peroxide stress in rice seedling leaves.** *Mol Cell Proteomics* 2008, **7**(8):1469-1488.
- Watanabe A, Hamada K, Yokoi H: **Biphasic and differential expression of cytosolic glutamine synthetase genes of radish during seed germination and senescence of cotyledons.** *Plant Mol Biol* 1994, **26**(6):1807-1817.
- Xing S, Zachgo S: **ROXY1 and ROXY2, two Arabidopsis glutaredoxin genes, are required for anther development.** *Plant J* 2008, **53**(5):790-801.
- Yamaguchi K, Mori H, Nishimura M: **A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin.** *Plant Cell Physiol* 1995, **36**(6):1157-1162.
- Yan J, Wang J, Tissue D, Holaday S, Allen R, Zhang H: **Photosynthesis and seed production under water-deficit conditions in transgenic tobacco plants that overexpress an Arabidopsis ascorbate peroxidase gene.** *Crop Science* 2003, **43**:1477-1483.
- Yan SP, Zhang QY, Tang ZC, Su WA, Sun WN: **Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice.** *Mol Cell Proteomics* 2006, **5**(3):484-496.
- Ye Z, Rodriguez R, Tran A, Hoang H, de los Santos D, Brown S, Vellanoweth RL: **The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in Arabidopsis thaliana.** *Plant Sci* 2000, **158**(1-2):115-127.
- Yoshida H, Nagato Y: **Flower development in rice.** *J Exp Bot* 2011, **62**(14):4719-4730.
- Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S: **Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses.** *Plant Physiol* 2000, **123**(1):223-234.
- Yruela I: **Copper in plants.** *Brazilian Journal of Plant Physiology* 2005, **17**:145-156.

- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X *et al*: **A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*)**. *Science* 2002, **296**(5565):79-92.
- Yuan Z, Gao S, Xue DW, Luo D, Li LT, Ding SY, Yao X, Wilson ZA, Qian Q, Zhang DB: **RETARDED PALEA1 controls palea development and floral zygomorphy in rice**. *Plant Physiol* 2009, **149**(1):235-244.
- Zavaleta-Mancera HA, Lopez-Delgado H, Loza-Tavera H, Mora-Herrera M, Trevilla-Garcia C, Vargas-Suarez M, Ougham H: **Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence**. *J Plant Physiol* 2007, **164**(12):1572-1582.
- Zentgraf U, Laun T, Miao Y: **The complex regulation of WRKY53 during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana***. *Eur J Cell Biol* 2010, **89**(2-3):133-137.
- Zhang A, Lu Q, Yin Y, Ding S, Wen X, Lu C: **Comparative proteomic analysis provides new insights into the regulation of carbon metabolism during leaf senescence of rice grown under field conditions**. *J Plant Physiol* 2010, **167**(16):1380-1389.
- Zhang H, Wang J, Nickel U, Allen RD, Goodman HM: **Cloning and expression of an *Arabidopsis* gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase**. *Plant Mol Biol* 1997, **34**(6):967-971.
- Zhu JK: **Plant Salt Tolerance**. *Trends in Plant Science* 2001, **6**:66-71.
- Zimmermann P, Heinlein C, Orendi G, Zentgraf U: **Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.** *Plant Cell Environ* 2006, **29**(6):1049-1060.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Lista de *primers* utilizados para construção de vetores.

| Construção | Vetor | Primers |
|-----------------------------|--------------|--|
| Silenciamento | pRNAiAPx1 | TACAAGGAGGCCACCTCA CCCGCATTTCATACCAACACA |
| Silenciamento | pRNAiAPx2 | CAAGTGACAAAGCCCTCAT AAGGCGCAAATAACAAATCG |
| Silenciamento | pRNAiAPx1/2 | CGCCGCCAACGCCGGCCTCGA CACTCAAACCCATCTGCGCA |
| Silenciamento | pRNAiAPx3 | GAAAGATCAGGATTTGATGGT CCCAGCTCAGATCGCTTCTTGT |
| Silenciamento | pRNAiAPx4 | TGACAAGGCATTGTTGGAAG CAGCTGCAGCAACAGCTACC |
| Silenciamento | pRNAiAPx3/4 | TCCTGATGCTAAGAAAG GGATCTTCCAACAATGCCT |
| Promotor | pProm3 | CACCTTGGATTTCTGCTGTTTTGC CGATCCGAGGAGAGGTGATA |
| Promotor | pProm4 | CACCAGGGAGCTCTCGTGTGTTTG CACTAGGAGTCAGGAAGCATGA |
| Hibridização <i>in situ</i> | pSISAPx3 | TATGCAGAGTCGCACAAGAAG CAACATAGCAGACTTAGCAGCA |
| Hibridização <i>in situ</i> | pSISAPx4 | GACTACGCTGAATCGCACAA GACACAAACCACTGTTCTTGTAGA |
| Hibridização <i>in situ</i> | pSISAP3 | GGCAGGTGACCTACTCGAAG GCCTCGTAGGAGTGCTTCAC |

APÊNDICE B - Lista de *primers* utilizados para análises de RT-qPCR.

| Gene id (TIGR) | Anotação | Primers |
|-----------------------|-----------------------------------|--|
| LOC_Os03g17690 | Ascorbato peroxidase 1 | CTACAAGGAGGCCACCTCA CCGCATTTTCATACCAACACA |
| LOC_Os07g49400 | Ascorbato peroxidase 2 | ACCTGAGGTCCCCTTCCA CTCTCCTTGTGGCATCTTCC |
| LOC_Os04g14680 | Ascorbato peroxidase 3 | GGAGTTGTTGCCGTTGAAGT ACCATCAAATCCTGATCTTTC |
| LOC_Os08g43560 | Ascorbato peroxidase 4 | TGACAAGGCATTGTTGGAAG CAGCTGCAGCAACAGCTACC |
| LOC_Os02g57040 | Formaldehyde dehydrogenase | CAAATCAGCTGGTGCTTCTC TTCCAATGCATTCAAAGCTG |
| LOC_Os03g08020 | Elongation factor | TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT GACTTCCTTCACGATTCATCGTAA |
| LOC_Os04g57320 | IMMUTANS | CAAACAGCAAGAGTCCCATGT CTGCATAGAGTGAGGAGAACGA |
| LOC_Os10g21268 | Ribulose bisphosphate carboxylase | CCTTCCAGGGGCTCAAGT TGGCAGGTAGGAGAGGGTCT |
| LOC_Os04g52450 | Os12 - aminotransferase | TGCTGGTTAGAGTTGCTGGA GCCTTGAGTGCATCTCCATA |
| LOC_Os03g21060 | OsNAP - no apical meristem | AAGACCAACTGGATCATGCAC CTTCTTGTAGATCCGGCACAG |
| LOC_Os06g06360 | WRKY | GAGGCTACACCAGATGATGG CGATACGTGCACCGGTAGT |
| LOC_Os01g51360 | Lipase | GCAGTGCCAAGGAGGATAAG GCAGCTCCGGCTTTACAT |

APÊNDICE C - Meios de cultura utilizados na transformação de arroz.

Apêndice C.1 - Meios de cultura de tecidos de arroz – *Oryza sativa* L. subespécie *japonica* cv. Nipponbare.

| Meios de cultura para arroz | | | | | | | |
|------------------------------------|--------------|--------------|-------------------|---------------|-------------------------------|----------------------------|-----------|
| | N6D | NB | NB líquido | NB-HTC | NB-Pré regeneração | NB- Regeneração | MS |
| Macro N6 | 100 ml/l | 100 ml/l | 100 ml/l | 100 ml/l | 100 ml/l | 100 ml/l | |
| Fe-EDTA | 10 ml/l | 10 ml/l | 10 ml/l | 10 ml/l | 10 ml/l | 10 ml/l | |
| Micro | 10 ml/l (N6) | 10 ml/l (B5) | 10 ml/l (B5) | 10 ml/l (B5) | 10 ml/l (B5) | 10 ml/l (B5) | |
| Vitaminas B5 | 1 ml/l | 10 ml/l | 10 ml/l | 10 ml/l | 10 ml/l | 10 ml/l | 10 ml/l |
| Caseína | 300 mg/l | 300 mg/l | 300 mg/l | 300 mg/l | 300 mg/l | 300 mg/l | |
| Glutamina | | 500 mg/l | 500 mg/l | 500 mg/l | 500 mg/l | 500 mg/l | |
| Prolina | 2,9 g/l | 500 mg/l | 500 mg/l | 500 mg/l | 500 mg/l | 500 mg/l | |
| 2,4D | 4,5 µM | 4,5 µM | 4,5 µM | 4,5 µM | 4,5 µM | 4,5 µM | |
| MS (Sigma) | | | | | | | 4,3 g |
| Sacarose | 30 g/l | 30 g/l | 30 g/l | 30 g/l | 30 g/l | 30 g/l | 30 g/l |
| Fitagel | 3 g/l | 3 g/l | 3 g/l | 3 g/l | 4,5 g/l | 4,5 g/l | 3 g/l |
| pH | 5.8 | 5.8 | 5.8 | 5.8 | 5.8 | 5.8 | 5.8 |
| Acetoseringona | | | | 19,62 mg/ml | | | |
| Higromicina | | | | 50 mg/l | | | 50 mg/l |
| Timentina | | | | 150 mg/l | | | |
| Cefotaxima | | | | 200 mg/l | | | |
| BAP | | | | | 2 mg/l | 3 mg/l | |
| ANA | | | | | 1 mg/l | 0,5 mg/l | |
| ABA | | | | | 5 mg/l | | |

Apêndice C.2 – Solução de Macronutrientes do N6.

| Estoques de Macronutrientes N6 | | | | |
|---|-------------|---------------------|-------------------|-----------------------|
| | mg/l | Concentração | mg/estoque | Volume estoque |
| (NH₄)₂SO₄ | 460 | 10x | 2,3 | 500 ml |
| KNO₃ | 2830 | 10x | 14,15 | |
| KH₂PO₄ | 400 | 10x | 2,0 | |
| MgSO₄.7H₂O | 190 | 10x | 0,95 | |
| CaCl₂.2H₂O | 170 | 10x | 0,85 | |

Apêndice C.3 - Solução de Micronutrientes do N6.

| Estoques de Micronutrientes N6 | | | | |
|---|-------------|---------------------|-------------------|-----------------------|
| | mg/l | Concentração | mg/estoque | Volume estoque |
| MnSO₄.4H₂O | 4,4 | 100x | 44 | 100 ml |
| ZnSO₄.7H₂O | 1,5 | 100x | 15 | |
| H₃BO₃ | 1,6 | 100x | 16 | |
| KI | 0,8 | 100x | 8 | |

Apêndice C.4 - Solução de Micronutrientes do B5.

| Estoques de Micronutrientes B5 | | | | |
|--|-------------|---------------------|-------------------|-----------------------|
| | mg/l | Concentração | mg/estoque | Volume estoque |
| MnSO₄.4H₂O | 10 | 100x | 1000 | 100 ml |
| Na₂MoO₄.2H₂O | 0,25 | 100x | 25 | |
| H₃BO₃ | 3,0 | 100x | 300 | |
| ZnSO₄.7H₂O | 2,0 | 100x | 200 | |
| CuSO₄.5H₂O | 0,039 | 100x | 3,87 | |
| CoCl₂.6H₂O | 0,025 | 100x | 2,5 | |
| KI | 0,75 | 100x | 75 | |

Apêndice C.5 - Solução de Vitaminas do B5 (Gamborg et al., 1968).

| Estoques de Vitamina B5 | | | |
|--------------------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|
| | Concentração | mg/estoque | Volume estoque |
| Tiamina | 10x | 1 | 500 ml |
| Piridoxina | 10x | 1 | |
| Ac. Nicotínico | 10x | 10 | |
| Mio-inositol | 10x | 100 | |

CURRICULO VITAE

Carolina Werner Ribeiro
Curriculum Vitae

Fevereiro/2012

Carolina Werner Ribeiro

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Carolina Werner Ribeiro
Filiação João Batista Ribeiro e Maria Julia Werner Ribeiro
Nascimento 28/02/1981 - Blumenau/SC - Brasil
Carteira de Identidade 37426001 SSP - SC - 07/11/2000
CPF 29314493857

Endereço profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia
Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43323 M - Sala 206
Agronomia - Porto Alegre
91501-570, RS - Brasil
Telefone: 51 33089816

Endereço eletrônico

e-mail para contato : caribeiro1@uol.com.br
e-mail alternativo : xuwerner@gmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

- 2008** Doutorado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Interação entre estresse oxidativo e estresse abiótico em arroz (*Oryza sativa*): o papel das isoformas citosólicas e peroxissomais de ascorbato peroxidase nas respostas de defesa
Orientador: Marcia M. A. N. Pinheiro Margis
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2005 - 2007** Mestrado em Genética e Evolução.
Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Sao Carlos, Brasil
Título: Estabelecimento de uma cana-de-açúcar transgênica superexpressando o gene da Canacistatina (CaneCPI-1), uma proteína inibidora de cisteíno-protease, Ano de obtenção: 2007
Orientador: Flávio Henrique Silva
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 1999 - 2003** Graduação em Ciências Biológicas.
Fundação Universidade Regional de Blumenau, FURB, Blumenau, Brasil
-

Atuação profissional

1. Fundação Universidade Regional de Blumenau - FURB

Vínculo institucional

| | |
|--------------------|---|
| 2002 - 2004 | Vínculo: Monitoria , Enquadramento funcional: monitor , Carga horária: 20, Regime: Dedicção Exclusiva |
| 2000 - 2002 | Vínculo: Bolsista de trabalho , Enquadramento funcional: bolsista , Carga horária: 20, Regime: Dedicção Exclusiva |

Idiomas

| | |
|------------------|---|
| Inglês | Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem |
| Espanhol | Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Razoavelmente |
| Português | Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem |

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Bonifacio, Aurenivia, MARTINS, MARCIO O., Ribeiro, Carolina W., FONTENELE, ADILTON V., CARVALHO, FABRICIO E. L., MARGIS-PINHEIRO, MÁRCIA, SILVEIRA, JOAQUIM A. G.

Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. *Plant, Cell and Environment (Print)*. , v.34, p.1705 - 1722, 2011.

2. FERNANDES, L, FISCHER, F, RIBEIRO, C. W., SILVEIRA, G, SA, M, NOME, F, TERENCEI, H

Metal-free artificial nucleases based on simple oxime and hydroxylamine scaffolds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. , v.18, p.4499 - 4502, 2008.

3. Ribeiro, Carolina W., Soares-Costa, Andrea, Falco, Maria Cristina, Chabregas, Sabrina M., Ulian, Eugênio C., Cotrin, Simone S., Carmona, Adriana K., Santana, Lucimeire A., Oliva, Maria Luiza V., Henrique-Silva, Flavio

Production of a His-tagged canecystatin in transgenic sugarcane and subsequent purification. *Biotechnology Progress*. , v.24, p.1060 - 1066, 2008.

Artigos aceitos para publicação

1. RIBEIRO, C. W., CARVALHO, FABRICIO E. L., ROSA, S. B., ALVES-FERREIRA, M., C. M. B. Andrade, Ribeiro-Alves, M., SILVEIRA, J. A., MARGIS, R., MARGIS-PINHEIRO, MÁRCIA

Modulation of genes related to specific metabolic pathways in response to cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants. *Plant Biology* (Stuttgart). , 2012.

Capítulos de livros publicados

1. ROSA, S. B., CAVERZZAN, A., RIBEIRO, C. W., LAZAROTTO, F., PASSAIA, G., SILVEIRA, J. A., FERREIRA-SILVA, S., MARGIS, R., MARGIS-PINHEIRO, M. Interação entre estresse oxidativo e estresses abióticos: o papel do sistema antioxidante na regulação das respostas de defesa In: *A FISIOLOGIA VEGETAL E OS DESAFIOS PARA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS E BIOENERGIA*.1 ed.Fortaleza : SPH Com Visual, 2009, v.1, p. 71-78.

Apresentação de Trabalho

1. RIBEIRO, C. W., ROSA, S. B., ALVES-FERREIRA, M., LAZAROTTO, F., Ribeiro-Alves, M., MARGIS, R., MARGIS-PINHEIRO, M.

FUNCTIONAL ANALYSES OF CYTOSOLIC ASCORBATE PEROXIDASE GENES IN THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF RICE (*Oryza sativa* L), 2011. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

2. RIBEIRO, C. W., ROSA, S. B., ALVES-FERREIRA, M., LAZAROTTO, F., MARGIS, R., MARGIS-PINHEIRO, M.

EFEITO DO SILENCIAMENTO PÓS-TRANSCRICIONAL DAS ISOFORMAS CITOSÓLICAS DE ASCORBATO PEROXIDASE NO TRANSCRIPTOMA DE ARROZ (*Oryza sativa*), 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

3. RIBEIRO, C. W., ROSA, S. B., ALVES-FERREIRA, M., LAZAROTTO, F., Ribeiro-Alves, M., MARGIS, R., MARGIS-PINHEIRO, M.

FUNCTIONAL ANALYSES OF CYTOSOLIC AND PEROXISOMAL ASCORBATE PEROXIDASE GENES IN THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF RICE (*Oryza sativa* L), 2010. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

4. RIBEIRO, C. W., ROSA, S. B., ALVES-FERREIRA, M., LAZAROTTO, F., MARGIS, R., MARGIS-PINHEIRO, M.

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF CYTOSOLIC AND PEROXISOMAL ASCORBATE PEROXIDASE GENES IN RICE (*Oryza sativa* L.), 2009. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

5. RIBEIRO, C. W., ROSA, S. B., ALVES-FERREIRA, M., LAZAROTTO, F., MARGIS, R., MARGIS-PINHEIRO, M.

EFEITO DO SILENCIAMENTO PÓS-TRANSCRICIONAL DOS GENES DE ASCORBATO PEROXIDASE OsAPX1 e OsAPX2 NO TRANSCRIPTOMA DE ARROZ (*Oryza sativa* L.), 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

6. SOARES-COSTA, A., RIBEIRO, C. W., CHABREGAS, S., FALCO, M. C., ULIAN, E. C., HENRIQUE-SILVA, F.
CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA CANA-DE-AÇÚCAR TRANSGÊNICA SUPEREXPRESSANDO UMA CISTATINA, 2007. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

7. RIBEIRO, C. W., NASCIMENTO, A. P.
ANÁLISE CITOGENÉTICA DE PORTADORES DE SÍNDROME DE DOWN NO MUNICÍPIO DE BLUMENAU – SC, 2004. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants**, 2011. (Outra)
FUNCTIONAL ANALYSES OF CYTOSOLIC ASCORBATE PEROXIDASE GENES IN THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF RICE (*Oryza sativa* L).

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal**, 2010. (Congresso)
EFEITO DO SILENCIAMENTO PÓS-TRANSCRICIONAL DAS ISOFORMAS CITOSÓLICAS DE ASCORBATO PEROXIDASE NO TRANSCRIPTOMA DE ARROZ (*Oryza sativa*).

3. Apresentação Oral no(a) **8 International Symposium on Rice Functional Genomics**, 2010. (Simpósio)
FUNCTIONAL ANALYSES OF CYTOSOLIC AND PEROXISOMAL ASCORBATE PEROXIDASE GENES IN THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF RICE (*Oryza sativa* L).

4. **UNITIG2010**, 2010. (Encontro)

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **2 Simposio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas**, 2009. (Simpósio)
FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF CYTOSOLIC AND PEROXISOMAL ASCORBATE PEROXIDASE GENES IN RICE (*Oryza sativa* L.).

6. **Curso PCR em tempo real: metodologias analíticas e quantitativas**, 2009. (Outra).

7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **54 Congresso Brasileiro de Genética**, 2008. (Congresso)
EFEITO DO SILENCIAMENTO PÓS-TRANSCRICIONAL DOS GENES DE ASCORBATO PEROXIDASE OsAPX1 e OsAPX2 NO TRANSCRIPTOMA DE ARROZ (*Oryza sativa* L.).

8. Apresentação de Poster / Painel no(a) **WORKSHOP DE COMEMORAÇÃO: 15 ANOS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E**

EVOLUÇÃO, 2006. (Outra). ESTABELECIMENTO DE UMA CANA-DE-AÇÚCAR TRANSGÊNICA SUPEREXPRESSANDO UM INIBIDOR DE CISTEÍNO-PROTEASE.

9. **XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2005. (Congresso).

10. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **50º CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA**, 2004. (Congresso)
ANÁLISE CITOGENÉTICA DE PORTADORES DE SÍNDROME DE DOWN NO MUNICÍPIO DE BLUMENAU – SC.

11. **MINI CURSO: A ARQUITETURA GENÔMICA E AS DOENÇAS GENÉTICAS HUMANAS**, 2004. (Outra).

12. **XXVIII SEMANA DA BIOLOGIA – “CONSERVANDO O PRESENTE PARA PRESERVAR O FUTURO”**, 2004. (Outra).

13. Apresentação Oral no(a) **PROGRAMA UNIVERSIDADE ABERTA – “LABORATÓRIO DE GENÉTICA E LABORATÓRIO DE MINERALOGIA”**, 2003. (Outra)
Conhecendo um Laboratório.

14. **TREINAMENTO BÁSICO DE PREVENÇÃO DE INCÊNDIOS**, 2003. (Oficina).

15. **XXVII SEMANA DA BIOLOGIA – “TERRA, AR E ÁGUA: 35 ANOS DE BIOLOGIA”**, 2003. (Outra).

16. **SEMINÁRIO COMUNICAÇÃO E GESTÃO AMBIENTAL**, 2003. (Seminário).

17. **CICLO DE TREINAMENTOS PARA IMPLEMENTAÇÃO DO SISTEMA DE GESTÃO AMBIENTAL: PROGRAMA DE GESTÃO DE RESÍDUOS PERIGOSOS**, 2003. (Seminário).

18. **SEMINÁRIO: NOÇÕES BÁSICAS DE ATENDIMENTO DE EMERGÊNCIA**, 2003. (Seminário).

19. **MINI CURSO: A CITOGENÉTICA NOS 50 ANOS DO DNA**, 2003. (Outra).

20. **MINI CURSO: ANÁLISES CLÍNICAS**, 2003. (Outra).

21. **49º CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA**, 2003. (Congresso).

22. **MINI CURSO: DOENÇAS GENÉTICAS: MECANISMOS PECULIARES DE HERANÇA**, 2002. (Outra).

23. **XXVI SEMANA DA BIOLOGIA – “PROFISSÃO BIÓLOGO”**, 2002. (Outra).

24. **MINI CURSO: SISTEMÁTICA E FILOGENÉTICA**, 2002. (Outra).
25. **CICLO DE TREINAMENTOS PARA IMPLEMENTAÇÃO DO SISTEMA DE GESTÃO AMBIENTAL: PROGRAMA DE GESTÃO DE RESÍDUOS PERIGOSOS**, 2002. (Simpósio).
26. **48° CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA**, 2002. (Congresso).
27. **XXV SEMANA DA BIOLOGIA - "GENÉTICA E EVOLUÇÃO"**, 2001. (Outra).
28. **MINI CURSO: VALIDAÇÃO FARMACOLÓGICA DE PLANTAS MEDICINAIS**, 2001. (Outra).
29. **III JORNADA CATARINENSE DE PLANTAS MEDICINAIS**, 2001. (Congresso).
30. **MINI CURSO: CITOGENÉTICA**, 2001. (Outra).
31. **XXIV SEMANA DA BIOLOGIA - "BIOÉTICA"**, 2000. (Outra).
32. **MINI CURSO: BIOLOGIA DE ANFÍBIOS**, 2000. (Outra).
33. **XXIII SEMANA DA BIOLOGIA - "BIODIVERSIDADE"**, 1999. (Outra).

Organização de evento

1. RIBEIRO, C. W.
Curso de Férias, 2010. (Outro, Organização de evento)

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. RIBEIRO, C. W., SEVEGNANI, L., SANTOS, D. W. R.
 Participação em banca de Kayla Müller. **Estresse Oxidativo em *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae) em Ambiente Natural e sob Cultivo invitro**, 2011
 (Ciências Biológicas) Fundação Universidade Regional de Blumenau

Totais de produção

Produção bibliográfica

| | |
|--|---|
| Artigos completos publicados em periódico..... | 3 |
| Capítulos de livros publicados..... | 1 |
| Apresentações de Trabalhos (Congresso)..... | 4 |

| | |
|--|----|
| Apresentações de Trabalhos (Simpósio)..... | 3 |
| Eventos | |
| Participações em eventos (congresso)..... | 7 |
| Participações em eventos (seminário)..... | 3 |
| Participações em eventos (simpósio)..... | 3 |
| Participações em eventos (oficina)..... | 1 |
| Participações em eventos (encontro)..... | 1 |
| Participações em eventos (outra)..... | 18 |
| Organização de evento (outro)..... | 1 |
| Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação)..... | 1 |