

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

Análise transcricional dos genes *ISA1*, *NFS1* e *ISU1* de *Eucalyptus grandis* sob estresse

LUISA ABRUZZI DE OLIVEIRA

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

Orientador: Jeverson Frazzon

Co-orientador: Giancarlo Pasquali

**Porto Alegre
Março de 2008**

Instituição e Fontes Financiadoras

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Biologia Molecular Vegetal (LBMV) e de Bioquímica de Microrganismos (LBqM) do Centro de Biotecnologia (CBiot) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Foram fontes financiadoras deste trabalho: Bolsa de Mestrado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCT); Projeto GENOLYPTUS.

Financiamentos do Projeto GENOLYPTUS: Fundo Setorial Verde-Amarelo do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) e as empresas de celulose e papel Aracruz Celulose S.A., Grupo Raiz, Celulose Nipo-Brasileira S.A. – CENIBRA, International Paper do Brasil Ltda., Jarí Celulose S.A., Klabin S.A., Lwarcel Celulose e Papel Ltda., Veracel Celulose S.A., Votorantim Celulose e Papel S.A., Zanini Florestal S.A. e Suzano-Bahia Sul Papel.

**“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”**

Albert Einstein

Agradecimentos

Ao meu orientador, Jeverson Frazzon, pela valiosa transmissão de conhecimentos, pelo apoio, discussões biológicas (ou não) e amizade sempre demonstrados no decorrer do trabalho.

Ao meu co-orientador Giancarlo Pasquali, pela dedicação, paciência, sugestões e atenção.

À professora Ana Paula Frazzon, por todo o incentivo, mesmo antes de meu ingresso no curso, pela ótima companhia no congresso, sugestões ... por tudo!

Ao professor Rogério Margis, pelos ensinamentos sobre a técnica de PCR em tempo real, análise estatística e revisão da dissertação.

Ao professor Adriano Brandelli, membro da comissão de acompanhamento.

À Michèle, rainha do Genolyptus, por todo o apoio técnico, minha companheira fiel das 8 da manhã que adora fazer uma indiada e carregar os galões de nitrogênio!

À Marina, por tornar o Laboratório e os momentos de estudo mais divertidos, por marcar os *happy hours* e apresentar-me o chasqueado.

À Fe Sperb, minha vizinha de bancada fashion, pela melhor nega-maluca, pelo estudo na piscina...

À Rochele, dinda do Genolyptus, pelo apoio nas diversas extrações de RNA.

À Dani, pelo companheirismo e pelo fornecimento de células competentes.

À Andréia, pelo ótimo humor durante todos os dias do ano, pela ajuda na construção dos cladogramas e por trazer guloseimas para o café.

Ao Gustavo, à Gabi, Sinara, Christine, Agnes e Fê Bastolla pela companhia, apoio, discussões e por tornarem o Laboratório mais alegre.

Ao Júlio, pela paciência e por me mostrar como a linha de corte melhora em muito a análise dos dados do PCR em tempo real.

À Maria de Lourdes, minha mãe, por ser exemplo de profissional, de amor, dedicação, por ter sido o contínuo apoio durante esses anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores.

Ao Fernando, meu pai, que mesmo não estando mais aqui, ter cuidado de mim, e me orientado a tomar algumas decisões.

À Gabriela, minha irmã, pelo carinho, cumplicidade e admiração.

Ao Carlitos, meu amor, por todo apoio “logístico”, pelo carinho, incentivo, paciência, companhia, por entender o que são os agrupamentos [Fe-S] e por tornar meus dias mais felizes.

Ao Centro de Biotecnologia da UFRGS, pela infra-estrutura que possibilitou à realização do trabalho.

Ao Projeto GENOLYPTUS e seus agentes financiadores, Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) e empresas de celulose e papel.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCT), pela Bolsa de Mestrado.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	8
Lista de figuras	9
Resumo	10
<i>Abstract</i>	11
Capítulo I REFERENCIAL TEÓRICO	12
1.1 Projeto Genolyptus	12
1.1.1 <i>Eucalyptus</i>	13
1.1.1.1 <i>Eucalyptus grandis</i>	16
1.2 Percepção e respostas vegetais aos estresses bióticos e abióticos	17
1.2.1 <i>Resfriamento</i>	18
1.2.2 <i>Estresse hídrico</i>	20
1.2.3 <i>Salinidade</i>	22
1.3 Sinalização por fitormônios	23
1.3.1 <i>Sinalização por ácido abscísico (ABA)</i>	24
1.3.2 <i>Sinalização por quinetina (kin)</i>	28
1.4 Agrupamentos [Fe-S]	29
1.4.1 <i>Estrutura e sistemas de biossíntese dos agrupamentos [Fe-S]</i>	30
1.4.2 <i>Proteínas Fe-S em plantas</i>	34
1.5 Objetivos	38
1.5.1 <i>Objetivo geral</i>	38
1.5.1.1 <i>Objetivos específicos</i>	38
Capítulo II TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF THE <i>EUCALYPTUS GRANDIS</i>	
<i>NFS1, ISU1 AND ISA1 GENES UNDER STRESS</i>	39

Capítulo III AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS DE MONTAGEM DE AGRUPAMENTOS [FE-S] EM RESPOSTA AO RESFRIAMENTO: EXPERIMENTO DE “<i>TIME-COURSE</i>”	66
3.1 Material e métodos	66
3.1.1 <i>Material vegetal</i>	66
3.1.1.1 <i>Germinação de sementes</i>	66
3.1.1.2 <i>Cinética de incubação</i>	66
3.1.1.3 <i>Extração de RNA</i>	66
3.1.1.4 <i>Síntese de cDNA</i>	67
3.1.1.5 <i>RT-PCR quantitativa em tempo real</i>	67
3.2 Resultados e discussão	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (Capítulos I e III)	72
ANEXOS	85
A	85
B	86
C	87
D	88

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

° C	graus Celsius
µg	micrograma(s)
µL	microlitro(s)
µM	micromolar(es)
ABA	ácido abscísico
bp	par(es) de bases
cDNA	DNA complementar
cm	centímetro(s)
C _T	<i>threshold cycles</i>
Cy3	fluoróforo Cyanina 3
Cys	cisteína
EST	fragmentos de seqüências de genes expressos (<i>expressed sequence tags</i>)
His	histona H2B
M	molar(es)
Mb	megabases (1.000.000 pb)
mg	miligrama(s)
min	minuto(s)
mL	mililitro(s)
mM	milimolar(es)
nm	nanômetro(s)
Rib	ribonucleoproteína L23A
U	unidade(s) de atividade enzimática

Lista de figuras

Capítulo I

Figura 1 Rota de biossíntese do ABA

Capítulo II

Figura 1 Phylogenetic tree showing the relatedness among plant iron sulfur cluster proteins.

Figura 2 Quantitative reverse transcription PCR analyses of *ISAI*, *ISUI* and *NFSI* relative expression from total RNA isolated from *E. grandis* treated seedlings.

Figura 3 *In silico* microarray analysis of relative gene expression profile between *E. grandis* leaves and xylem.

Figura 4 *In silico* microarray analysis of relative gene expression profile between *E. grandis* and *E. globulus* xylem.

Capítulo III

Figura 1 Expressão relativa dos genes envolvidos na biossíntese dos agrupamentos [Fe-S] (*ISAI*, *ISUI* e *NFSI*) sob estresse por resfriamento (4° C).

Resumo

Os agrupamentos de ferro-enxofre (Fe-S) são grupos prostéticos necessários para a manutenção da vida, pois estão envolvidos em diversos processos incluindo a transferência de elétrons, reações metabólicas, sinalização e regulação da expressão gênica. As plantas realizam fotossíntese e respiração, dois processos que requerem proteínas Fe-S, sendo os únicos organismos em que a síntese destas proteínas é compartimentalizada. Diversos fatores afetam o desenvolvimento das plantas, entre eles, a temperatura baixa, fator limitante à produtividade e à distribuição geográfica das plantas, incluindo *Eucalyptus grandis*, uma espécie com grande importância econômica. Neste trabalho foi realizada uma análise transcricional dos genes *NFS1*, *ISAI* e *ISU1* de *E. grandis* após diferentes estímulos por meio de PCR quantitativa (qRT-PCR) e microarranjos. Após o tratamento de plântulas de *E. grandis* com frio, foram realizados experimentos de qRT-PCR. Os resultados foram normalizados com os genes constitutivos codificadores da histona H2B e da ribonucleoproteína L23A. Considerando tal normalização, *ISU1* aumentou sua expressão em 0,6 e 1,7 vezes, *NFS1* apresentou um aumento de 6 e 8 vezes, enquanto *ISAI* apresentou um aumento de 69 a 114 vezes em relação à condição controle. Utilizando-se a técnica de microarranjos, foi analisada a diferença de expressão entre folhas e xilema de árvores maduras de *E. grandis*. O gene *NFS1* apresentou maior expressão nas folhas do que em xilema, porém os genes *ISAI* e *ISU1* apresentaram um padrão de expressão equivalente entre os dois tipos de tecidos. Esses resultados sugerem que (i) os genes *NFS1* e *ISAI* podem estar relacionados à resposta celular ao estresse causado por frio; e que (ii) os aumentos na expressão devem-se, provavelmente, ao metabolismo de enxofre e à indução de enzimas antioxidantes. Foi também realizado um experimento de curva de tempo com a submissão de plântulas de *E. grandis* ao resfriamento, objetivando-se verificar em que momento esses genes começam a ter suas expressões aumentadas. O gene *ISU1* apresentou maior expressão gênica nas primeiras duas horas de tratamento, caindo drasticamente logo após este período. O gene *ISAI*, que havia apresentado a maior expressão relativa no experimento anterior, não apresentou diferença significativa no padrão de expressão durante as 16 horas de resfriamento, assim como o gene *NFS1*. Esses resultados indicam que as proteínas Fe-S, frente ao resfriamento, estão possivelmente envolvidas na recuperação das plantas após tal estresse.

Abstract

Iron-sulfur (Fe-S) clusters are prosthetic groups required for the maintenance of life because they are involved in various vital processes, including electron transfers, metabolic reactions, signaling and regulation of gene expression. Plants perform photosynthesis and respiration, two processes that require Fe-S proteins, and are the only organisms in which the synthesis of these proteins is compartmentalized. Several factors and stresses affect the development of plants including low temperature, which is a productivity-limiting factor and restricts plants to certain geographical distributions, including *Eucalyptus grandis*, a species with significant economic importance. The aim of this study is to perform an analysis of *E. grandis NFS1* and *ISAI* gene expressions after different stimuli through quantitative PCR (qRT-PCR) and microarrays. qRT-PCR experiment were conducted on plants submitted to a cold treatment. The results were normalized with the housekeeping genes encoding histone H2B and ribonucleoprotein L23A. Considering such normalizations, *ISUI* increased the expression 0.6 and 1-fold, *NFS1* showed a 6 and 8-fold increase in comparison with the control condition, while *ISAI* gene increased 69 and 114-fold. Using microarrays, the difference in expression between leaves and xylem of *E. grandis* was analyzed. The *NFS1* gene showed higher expression in leaves than in xylem, but the *ISAI* and *ISUI* showed equivalent pattern of expression in both types of tissues. These results suggest that (i) *NFS1* and *ISAI* genes are related to the cellular response to the stress caused by chilling, and that (ii) the increased expression should be probably due to the metabolism of sulfur and to the induction of antioxidative enzymes. A time-course experiment was also conducted during the cold stress of *E. grandis* plants to look at which moment these genes begin to increase their expressions. The *ISUI* gene showed higher expression in the first 2 hours of treatment, and then decreased severally after this period. The *ISAI* gene, which had shown the highest expression in the previous experiment, did not show significant differences in the pattern of expression during the 16 hours of chilling treatment, as well as the *NFS1* gene. These results indicate that Fe-S proteins, in response to low temperature, are possibly involved in the recovery of the plants after this stress.

Capítulo I REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Projeto Genolyptus

Lançado oficialmente em 2002 pelo Ministério de Ciência e Tecnologia, com recursos do Fundo Setorial “Verde-Amarelo” e de empresas de celulose e papel, o Projeto Genolyptus conta com a participação de 14 empresas e dez centros de pesquisa. O principal objetivo do projeto é a descoberta, seqüenciamento, mapeamento e determinação de genes de interesse econômico para diversas espécies de *Eucalyptus*, visando a incorporação de tecnologias de genômica em programas de melhoramento genético e produção florestal, buscando plantas mais resistentes a moléstias e a estresses bióticos e abióticos.

O projeto possui oito subprojetos que englobam programas experimentais a campo, implementação de tecnologias para avaliação da qualidade da madeira, construção de mapas genéticos e físicos para o mapeamento de QTLs, investigações de base genética e identificação de genes que conferem resistência a doenças e pragas, características de madeira e qualidades silviculturais diversas

No subprojeto “Seqüenciamento do Transcriptoma de *Eucalyptus*” foram obtidas 96.493 marcas ou seqüências de genes expressos (do inglês, “*Expressed Sequence Tags*” ou ESTs) válidas, incluindo 21.905 seqüências gênicas únicas que foram depositadas nas centrais de bioinformática do Projeto Genolyptus (Bastolla, 2007).

Em janeiro de 2005, teve início o projeto *WoodGenes*, ou “Gênese de Madeira em *Eucalyptus*: Genes, Funções, Regulação e Expressão Transgênica”, o qual tem como objetivo explorar os clones de cDNA gerados no projeto Genolyptus, avaliar a função gênica das seqüências isoladas e o potencial destas em proporcionar características de interesse econômico por meio da expressão transgênica. Para isso, foram planejados e estão sendo analisados experimentos de microarranjos de DNA (Bastolla, 2007).

No ano de 2007, foi aprovado junto ao *Joint Genome Institute* (JGI) do Departamento de Defesa dos Estados Unidos da América o projeto do seqüenciamento do genoma do *Eucalyptus* na íntegra. Esse projeto foi organizado por pesquisadores dos Estados Unidos, Brasil e África do Sul, contando também com a participação de pesquisadores da Austrália, Portugal, França e Suécia. A análise computacional, a anotação e a montagem do genoma serão realizadas nos Estados Unidos e os dados ficarão

disponíveis em banco de dados público. A espécie selecionada para o estudo foi *E. grandis*, o eucalipto tropical, pelas diversas vantagens e qualidades descritas na seção posterior.

A partir dos resultados de anotação automática da potencial identidade funcional das seqüências depositadas no banco de dados do Genolyptus (Laboratório de Genômica e Expressão Gênica, Universidade de Campinas, <http://www.lge.ibi.unicamp.br/eucalyptus/>; Laboratório de Bioinformática, Universidade Católica de Brasília, <http://www.genoma.ucb.br/SistemaGenoma/>), foram identificadas nesse estudo seqüências únicas (*singlets*) de ESTs ou grupos de seqüências (*clusters*) potencialmente codificadores de proteínas de *Eucalyptus* relacionadas à biossíntese dos agrupamentos [Fe-S]. Após a reunião de todas estas seqüências disponíveis no banco de dados do GENOLYPTUS, foram selecionados clones de cDNA potencialmente completos, isto é, caracterizados pela presença do códon de início de tradução ATG. Considerando que os cDNAs foram gerados a partir de oligonucleotídeos com complementaridade às caudas de poli(A), subentende-se que todos os produtos de síntese, ou a sua maioria, possuem a região 3'-terminal e, por conseguinte, os códons de terminação da tradução. Finalmente, os clones representantes de *NFS1*, *ISAI* e *ISUI* foram investigados em maior profundidade. Os resultados destas análises constituem o foco principal da presente Dissertação, descritos nos Capítulos II e III.

1.1.1 *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família *Myrtaceae* e é conhecido por sua ampla variedade genética, englobando mais de 670 espécies descritas. É originário da Austrália, de clima temperado e sub-tropical, mas de fácil adaptação em outras diversas condições climáticas. A diversidade de espécies decorre, entre outros, devido ao seu hábito alógamo, da resposta à pressão de seleção causada pelas alterações do meio ambiente e do próprio processo de deriva e especiação. Possui fibras delgadas, curtas, rígidas e de granulação reduzida. O número de fibras por grama é alto e as microfibrilas apresentam uma pequena angulação em torno do eixo da fibra. Todas essas características proporcionam uma estrutura adequada para a produção de papel de alta qualidade e alta opacidade, o que é de grande interesse comercial. Esse gênero possui um genoma de aproximadamente 630 Mb e

a análise cariotípica de 108 espécies indica que 95 apresentam um número básico de cromossomos $2n=22$, da mesma forma que a maioria dos gêneros da família Myrtaceae (Santos, 2005; Eldridge *et al.*, 1994).

O plantio de florestas de eucalipto constitui uma das melhores alternativas para atender às diversas demandas da sociedade no que diz respeito ao consumo de produtos de base florestal, seja na área de papel, celulose e derivados, como na área de siderurgia. Entretanto, esse consumo vem atrelado às exigências de sustentabilidade da produção de biomassa florestal (Santos, 2005). O eucalipto é plantado, atualmente, na maioria das regiões de clima tropical e subtropical do mundo, entre as latitudes 40°N e 45°S (González, 2002). O mosaico formado pela distribuição das espécies reflete diferentes adaptações a uma grande variação de clima e solo. São centenas de espécies com propriedades físicas e químicas e características mecânicas e estéticas tão diversas que fazem com que os eucaliptos sejam utilizados para as mais distintas finalidades, dispensando o uso de espécies latifoliadas nativas (Pereira *et al.*, 2000). Devido ao seu rápido crescimento e a qualidade de suas fibras, o *Eucalyptus* é a árvore mais comumente plantada no mundo, em particular para a fabricação de papel. Entretanto, apesar de amplamente distribuída, sua extensão é restrita a algumas áreas por apresentar sensibilidade ao congelamento (Kayal *et al.*, 2006).

Os exemplares mais antigos de eucalipto encontrados no Brasil foram plantados pelo Imperador Dom Pedro I no Jardim Botânico do Rio de Janeiro em 1825. Seu cultivo em escala econômica deu-se a partir de 1904, com o trabalho do agrônomo silvicultor Edmundo Navarro de Andrade, para atender à demanda da Companhia Paulista de Estradas de Ferro (Revista da Madeira, n. 107, 2007). No Brasil, os programas de melhoramento genético começaram a surgir na década de 1970, com o objetivo de encontrar espécies mais adaptadas às condições ambientais e propiciar o aumento do conjunto genético e da qualidade das plantas (Brune & Zobel, 1981).

O plantio de *Eucalyptus* no Brasil já ocupa mais de 3,5 milhões de hectares e continua crescendo. Em 1966, a área plantada era de cerca de 600 a 700 mil hectares. Após a implementação da Lei 5.106, que define programas de incentivos fiscais ao reflorestamento, a área plantada de eucalipto aumentou em mais de três vezes até 1992 (Lima, 1993). Um dos motivos dessa expansão foi a elevada produtividade das florestas, resultado do esforço de equipes de pesquisa e operacionais de empresas, bem como de

universidades e institutos de pesquisa ao longo dos últimos 35 anos. No entanto, a compreensão científica dos processos físicos e biológicos que governam esse crescimento permanece pouco caracterizada e essa falta de conhecimento limita a simulação de cenários em escalas espaciais e temporais maiores às usualmente utilizadas nos experimentos empíricos tradicionais (IPEF, 2007).

As cadeias produtivas relacionadas com florestas respondem, pelo menos, por 4% do Produto Interno Bruto do Brasil, assim como por 6,5 milhões de empregos e por mais de 7% das exportações brasileiras. Por outro lado, as plantações florestais cumprem um papel importante para a conservação das florestas naturais, pois as plantações diminuem a pressão de exploração nas florestas naturais, especialmente de produtos de menor valor *in natura* como toras para celulose, carvão e energia. Também o setor de florestas plantadas tem um dos melhores desempenhos do setor de cultivo em geral, na manutenção e recuperação de Áreas de Preservação Permanente e Reserva Legal. São mais de 1,5 milhões de hectares de florestas naturais conservadas nas áreas de plantio florestal no Brasil (Revista da Madeira, n. 108, 2007).

Apesar disso, mesmo diante das diversas possibilidades de aproveitamento do eucalipto, poucas espécies têm sido plantadas em escala comercial. Isso se deve à necessidade de produção de madeira de alta qualidade e, para tanto, duas estratégias são empregadas. A primeira e mais utilizada consiste em melhorar geneticamente a madeira das espécies mais plantadas e, a segunda, consiste na identificação de espécies produtoras de madeira com características satisfatórias para o uso que se pretende, com programas posteriores destinados a aumentar a produtividade (Santos, 2005).

Em função do rápido crescimento das plantações de eucalipto que atingem produtividade cerca de dez vezes maiores que a dos países líderes desse mercado, o Brasil vem ganhando posições de destaque no mercado. Para se ter idéia, o crescimento das florestas na Finlândia, país tradicionalmente florestal, alcança em média rendimentos de 5 m³/ha.ano, Portugal, 10, Estados Unidos, 15, África do Sul, 18, e Brasil, 35, porém podendo alcançar de 60 a 70 m³/ha.ano (Revista da Madeira, n. 107, 2007).

O Brasil é um país de dimensão continental e de condições de clima e solo altamente favoráveis para a implantação de florestas. O desenvolvimento das espécies exóticas utilizadas, principalmente o *Pinus* e o eucalipto, demonstram resultados espetaculares, com ciclos silviculturais entre seis e sete anos, bem diferentes dos países de

grande tradição florestal como Suécia, Canadá e Austrália, cujos ciclos nunca são inferiores aos 60 e 80 anos. No caso específico do Brasil, o eucalipto possui um caráter estratégico, uma vez que a sua madeira é responsável pelo abastecimento da maior parte do setor industrial de base florestal. Atualmente, produzem-se 6,4 milhões de toneladas de celulose por ano a partir da madeira de eucalipto, representando mais de 70% da produção nacional. Um número também impressionante é o do setor de carvão vegetal, com uma produção anual de 18,8 milhões de metros cúbicos, representando mais de 70% da produção nacional; outro setor importante é o de chapa de fibra, com uma produção anual de 558 mil metros cúbicos, representando 100% da produção nacional; e, finalmente, o setor de chapas de fibra aglomerada produz 500 mil metros cúbicos, representando quase 30% da produção nacional (Revista da Madeira, n. 92, 2005).

A expansão dos plantios nos últimos anos tem suprido a crescente demanda de matéria-prima para a produção de celulose e papel, carvão vegetal, óleos essenciais, madeira sólida para serraria, postes de eletricidade, entre outras. Mais recentemente, o setor privado demonstrou interesse pelo uso das florestas de eucalipto para a fixação de carbono, visando diminuir a concentração de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera (Alfenas *et al.* , 2004).

1.1.1.1 *Eucalyptus grandis*

Entre as espécies de *Eucalyptus* mais exploradas em países tropicais e subtropicais está *E. grandis*. Sua área de ocorrência natural estende-se em forma descontínua e fragmentada por uma longa faixa costeira ao longo da Austrália, desde Newcastle até Atherton. O clima nesta região varia de temperado quente à subtropical moderado, com invernos suaves e chuvas abundantes e bem distribuídas (Eldridge *et al.* , 1994).

A madeira de *E. grandis* é leve e fácil de ser trabalhada, sendo utilizada intensivamente na Austrália e na África do Sul como madeira de construção, quando oriunda de plantações de ciclo longo. A madeira produzida em ciclos curtos é utilizada para fabricação de caixas. Plantações convenientemente manejadas podem produzir madeira de excelente qualidade para serraria e laminação (Santos, 2005).

E. grandis apresenta um bom desenvolvimento em regiões de clima tropical e subtropical, além de conter um ótimo teor de celulose (em torno de 48%) e possuir um bom crescimento volumétrico. É a principal fonte de matéria-prima para celulose e papel no Estado de São Paulo (Santos, 2005). A maior restrição encontrada pelas indústrias está nos elevados índices de ligninas em sua madeira, cerca de 24% de lignina total (Colodette *et al.*, 2004). Essa espécie é susceptível ao cancro do eucalipto (*Cryphonectria cubensis*) e é a espécie mais plantada fora da Austrália (Santos, 2005). Em virtude de suas características silviculturais e a qualidade de sua madeira, *E. grandis* é a espécie mais explorada no Brasil para a geração de híbridos de alta produtividade.

1.2 Percepção e Respostas Vegetais aos Estresses Bióticos e Abióticos

O estresse, em termos físicos, é definido como a força mecânica aplicada por unidade de área em um objeto. Em resposta ao estresse, um objeto sofre uma alteração na sua dimensão. Como plantas são sésseis, é difícil medir tal força (= estresse) e, portanto, difícil definir o significado de estresse em termos biológicos. Uma condição biológica que se constitui em estresse para uma planta pode ser uma condição ótima para outra. A definição mais prática para estresse biológico é a de uma força ou condição adversa que inibe o funcionamento normal de um sistema biológico, como as plantas (Jones & Jones, 1989).

Diversos estresses abióticos resultam em efeitos gerais e específicos no crescimento e no desenvolvimento da planta (Zhu, 2002). O sinal de estresse é primeiramente percebido na membrana plasmática por receptores e, posteriormente, transmitido para o interior da célula, o que resulta na ativação de vários genes estresse-responsivos para prover tolerância ao estresse (Vashisht & Tuteja, 2006). Tolerância ou suscetibilidade a estresses abióticos são fenômenos complexos, em parte porque o estresse pode ocorrer em múltiplos estádios do desenvolvimento da planta e, freqüentemente, mais de um tipo de estresse afeta a planta simultaneamente (Chinnusamy *et al.*, 2004).

A seca, a salinidade e as temperaturas extremas caracterizam-se por promover a deficiência hídrica em plantas. Por estarem geralmente inter-relacionadas, essas condições podem levar a danos celulares semelhantes como, por exemplo, ao estresse oxidativo e a perturbação do equilíbrio osmótico e iônico das células (Wang *et al.*, 2003). Essas formas de estresse induzem a ativação de genes das vias de sinalização celular (Shinozaki &

Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Zhu, 2001) e de respostas celulares semelhantes como a produção de proteínas de estresse, a superexpressão de substâncias antioxidantes e o acúmulo de solutos compatíveis capazes de minimizar os danos celulares (Cushman & Bonert, 2000).

Na última década, muitas investigações tiveram como foco principal a identificação e a caracterização de genes regulados pelo estresse com o objetivo de melhor entender o funcionamento dos mecanismos de tolerância ao estresse, e prover a base de estratégias eficientes para os programas de melhoramento genético de plantas (Thomashow, 2001). Antes de discuti-los, no entanto, será necessário melhor caracterizar os principais estresses responsáveis pela deficiência hídrica e as respostas vegetais aos mesmos.

1.2.1 Resfriamento

As baixas temperaturas induzem um grande número de alterações nos componentes celulares, incluindo variações sobre taxas de ácidos graxos insaturados (Cossins, 1994), composição de glicerol-lipídeos (Lynch & Thompson, 1982), mudanças na composição de proteínas e carboidratos e ativação de canais de íons (Knight *et al.*, 1996). As temperaturas de resfriamento caracterizadas como estresse são aquelas demasiadamente baixas para o crescimento vegetal normal, mas não suficientes para a formação de gelo. Como consequência direta do resfriamento podem ocorrer danos que se caracterizam por descoloração ou lesões nas folhas. Com o resfriamento de raízes, a planta reduz sua capacidade de captação de água e pode murchar (Taiz & Zeiger, 2004).

Três características importantes das lesões causadas pelo resfriamento incluem (i) o fato de serem distintas daquelas causadas por congelamento; (ii) as lesões se expandem ainda mais quando os tecidos danificados são transferidos para temperaturas de não resfriamento; e (iii) o reconhecimento de que existe uma temperatura crítica (geralmente de 10 a 12°C), abaixo da qual os danos se tornam realmente significativos (Sonoike, 1998).

O fechamento estomático reduz a concentração de dióxido de carbono (CO₂) no espaço intracelular, enquanto a deterioração dos cloroplastos aumenta. A redução desse espaço foi observada em plantas sensíveis ao resfriamento (Sonoike, 1998). O dano à função dos cloroplastos pode ser induzido por baixas temperaturas até mesmo no escuro. Esta inativação da fotossíntese em baixas temperaturas e na ausência de luz é reversível: demonstrou-se que a incubação de folhas previamente refrigeradas à temperatura ambiente

com luz moderada após 30 minutos permitiu às folhas restaurarem suas atividades fotossintetizantes conforme medido pela evolução de oxigênio (Terashima *et al.*, 1989).

As membranas das células vegetais são constituídas de uma bicamada lipídica entremeadada com proteínas e esteróis. As propriedades físicas dos lipídeos têm grande influência sobre as atividades das proteínas integrais de membrana como, por exemplo, H⁺-ATPase, transportadores e proteínas formadoras de canais que regulam o transporte de íons e outros solutos, assim como o transporte de enzimas das quais depende o metabolismo. Como as membranas se tornam menos fluídicas com o resfriamento, seus compostos protéicos podem não funcionar normalmente (Taiz & Zeiger, 2004).

A sensibilidade das células vegetais ao resfriamento tem sido atribuída à transição de fases das membranas lipídicas (Wu *et al.*, 1997), ao bloqueio das funções de tradução, à modificação nos plastídeos (Tokuhisa *et al.*, 1998) e ao desbalanço metabólico (Levitt, 1980). Proteínas de choque térmico (do inglês, *heat shock proteins* ou HSPs) são sintetizadas em resposta ao frio, bem como à desidratação. Estas proteínas atuam como chaperonas protegendo as proteínas associadas durante os processos de desidratação e re-hidratação, mantendo suas estruturas terciárias e minimizando a agregação e degradação das proteínas (Feder & Hofmann, 1999). Estudos realizados por Anderson *et al.* (1994) mostraram que o gene *hsp70* de espinafre contribui significativamente para a tolerância ao congelamento por meio da estabilização de proteínas, contra a desnaturação induzida pelo frio.

O melhoramento genético visando aumentar a insaturação de ácidos graxos das membranas celulares vegetais mostrou incrementar a tolerância ao resfriamento em algumas plantas (Ishizaki-Nishizawa *et al.*, 1996; Ishitani *et al.*, 1997). Em plantas naturalmente resistentes à refrigeração como, por exemplo, *Arabidopsis thaliana*, a expressão gênica induzida por baixas temperaturas é crítica para a tolerância adquirida ao congelamento (Gong *et al.*, 2002).

Em plantas sensíveis ao resfriamento, a função cloroplastídica parece ser a mais afetada. Diversos tipos de danos têm sido descritos para diferentes condições de resfriamento (Sonoike, 1998).

A resposta das plantas ao resfriamento são multigênicas e os mecanismos moleculares da sensibilidade ou da tolerância não são bem compreendidos (Tokuhisa & Browse, 1999). Sabe-se, no entanto, que as folhas danificadas por resfriamento apresentam

inibição da fotossíntese, taxas respiratórias baixas, lenta translocação de carboidratos, inibição da síntese de proteínas e degradação de proteínas existentes. Todas essas respostas parecem depender de um mecanismo primário comum, envolvendo a perda de função das membranas celulares durante o resfriamento (Taiz & Zeiger, 2004).

1.2.2 Estresse hídrico

O estresse hídrico pode ser resultado de duas condições diferentes, o excesso de água ou o déficit hídrico. Inundações caracterizam um exemplo de excesso de água que, primariamente, resulta em redução no fornecimento de oxigênio para as raízes, levando ao mau funcionamento de funções críticas tais como a respiração e a absorção de nutrientes. O estresse hídrico mais comum, no entanto, é a deficiência de água, comumente chamada de seca (Mahajan & Tuteja, 2005).

A primeira resposta das plantas quando estão sob condições de déficit hídrico é o fechamento dos estômatos para diminuir a perda de água por transpiração (Mansfield *et al.*, 1990). Outro efeito fisiológico da seca nas plantas é a redução do crescimento vegetativo, em particular da parte aérea. A redução da atividade de proteínas reguladoras do ciclo celular como as ciclinas dependentes de quinases resultam em divisão celular mais lenta e inibição do crescimento sob condições de déficit hídrico (Schuppler *et al.*, 1998). O crescimento foliar é mais sensível à seca que o crescimento radicular. A redução da expansão foliar é benéfica em plantas sob déficit hídrico, pois uma menor área foliar exposta resulta em diminuição na transpiração. Por outro lado, o crescimento relativo das raízes aumenta, facilitando a extração de água dos solos mais profundos (Mahajan & Tuteja, 2005).

Como consequência do déficit hídrico, diversas mudanças ocorrem nas células, incluindo o nível de expressão dos genes codificadores de proteínas de abundância tardia na embriogênese (do inglês, “*late embryogenesis abundant*” ou LEAs) e a síntese de chaperonas que protegem as proteínas associadas da degradação e da ação de proteinases que, por sua vez, removem as proteínas desnaturadas e danificadas (Mahajan & Tuteja, 2005). Esse tipo de estresse também leva à ativação de proteínas envolvidas na produção e na remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Zhu, 2002). As EROs atuam como

mensageiros secundários na transdução do sinal redox e mediam eventos hormonais (Foyer & Noctor, 2003).

Além do dano à membrana, proteínas citosólicas e organelares podem exibir redução de atividade ou desnaturarem quando desidratadas. A alta concentração de eletrólitos celulares, devido à desidratação do protoplasma, pode também causar interferências no metabolismo celular (Mahajan & Tuteja, 2005).

Outro grupo de moléculas relacionadas ao estresse hídrico é o das poliaminas, que são polications de baixa massa molecular. Em plantas, elas estão envolvidas em uma série de processos biológicos tais como crescimento, desenvolvimento e resposta a estresses abióticos. As principais formas de poliaminas acumuladas em vegetais são putrescina, espermidina e espermina (Watson *et al.*, 1998; Rácz *et al.*, 2008).

Existem quatro mecanismos básicos de resposta vegetal ao estresse hídrico: (i) eliminação de radicais livres formados pelo desequilíbrio fisiológico da célula; (ii) proteção de estruturas celulares contra danos provocados pelo estresse; (iii) manutenção da integridade das proteínas celulares; e (iv) regulação osmótica da célula (Ramanjulu & Bartels, 2002). Porém, a expressão dos genes induzidos pelo déficit hídrico não garante que um produto gênico promova a habilidade da planta em sobreviver ao estresse (Bray, 1993).

A regulação da resposta ao estresse hídrico ocorre basicamente por intermédio dos sistemas dependentes de ácido abscísico, ABA-dependentes e ABA-independentes (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Para o processo de fechamento estomático, conhecido como fechamento hidroativo, são necessários íons e metabólitos, e este parece ser regulado via ABA. Muitos dos genes responsivos à seca estudados até hoje são induzidos por fatores de transcrição que respondem ao acúmulo de ABA, evidenciando o papel vital deste sinalizador (Xiong *et al.*, 2002). O fechamento estomático leva à diminuição da taxa fotossintética (Mahajan & Tuteja, 2005). As condições ambientais que aumentam a taxa de transpiração resultam em aumento do pH foliar, o que pode promover o acúmulo de ABA e a redução da condutância nos estômatos (Wilkinson & Davies, 2002).

1.2.3 Salinidade

Diante da escassez global dos recursos aquáticos e do aumento da salinidade do solo e da água, o estresse abiótico é o maior fator limitante para o crescimento das plantas, tornando-se em breve cada vez mais severo em decorrência da desertificação que se apresenta de forma crescente no território terrestre mundial (Vinocur & Altman, 2005). A seca e a salinidade já existem em diversas regiões do mundo e deverão causar sérias salinizações em mais de 50% das terras áridas por volta do ano de 2050 (Ashraf, 1994). A salinidade do solo existe antes mesmo dos humanos e da agricultura, porém esse problema tem se agravado pelas práticas agrícolas como, por exemplo, a irrigação (Zhu, 2001b).

As raízes das plantas constantemente deparam-se com vários estímulos ambientais no solo como, por exemplo, obstáculos físicos e desbalanços da distribuição de água e/ou nutrientes. Devido a estes estímulos, as células vegetais desenvolveram mecanismos regulatórios adaptativos para perceber e responder tanto aos sinais internos como aos externos (Sun *et al.*, 2008).

A regulação celular da homeostase de íons durante o estresse salino é crítico para a tolerância ao sal. Uma das respostas das células ao estresse salino é a geração de íons cálcio divalentes (Ca^{2+}) de forma transitória no citosol e a subsequente ativação da expressão e/ou atividade de proteínas sensoras de Ca^{2+} (Chinnusamy *et al.*, 2004).

Até recentemente, pouco se sabia sobre os alvos da via de sinalização do estresse salino *in vivo* em organismos vegetais. Entretanto, a identificação da via SOS (do inglês, “*Salt-Overley-Sensitive*”) em *Arabidopsis* revelou alguns componentes e mecanismos envolvidos na resposta das plantas ao estresse iônico. Análises moleculares de mutantes *sos* de *Arabidopsis* levaram à identificação de componentes (proteínas SOS1, SOS2 e SOS3) da rota que transduz o sinal Ca^{2+} induzido pelo estresse salino para o restabelecimento da homeostase celular iônica (Zhu, 2002).

Altas concentrações de sal causam desequilíbrio iônico e estresse hiperosmótico em plantas. Como consequência desses efeitos primários, estresses secundários ocorrem como, por exemplo, danos oxidativos. A integridade das membranas celulares, a atividade de diversas enzimas, a aquisição de nutrientes e o funcionamento do aparato fotossintético são suscetíveis aos efeitos tóxicos do estresse salino. Como discutido anteriormente, uma importante causa de danos secundários às células vegetais pode ser a geração de EROs pelo estresse por sal.

Existem três aspectos da tolerância ao sal em plantas, são eles: (i) homeostase; (ii) detoxificação; e (iii) controle do crescimento (Zhu, 2001b). A habilidade das plantas tolerarem o excesso salino é determinada por múltiplas rotas bioquímicas que facilitam a retenção e/ou a aquisição de água, que protegem a função plastídica e que mantêm a homeostase iônica. As rotas essenciais são as que levam à síntese de metabólitos osmoticamente ativos, proteínas específicas e enzimas que detoxificam radicais livres. Diversas espécies de plantas tolerantes ao excesso de sal acumulam metabólitos metilados, os quais possuem importante papel como osmoprotetores e detoxificadores de radicais. A síntese desses metabólitos está relacionada com o estresse induzido pelo aumento na taxa da fotorrespiração (Parida & Das, 2005).

1.3 Sinalização por Fitormônios

O crescimento e a resposta das plantas a condições de estresse são controlados por hormônios. Fitormônios como ácido salicílico, ácido jasmônico, etileno e ABA são moléculas endógenas de baixo peso molecular que primariamente regulam as respostas de defesa das plantas contra os estresses bióticos e abióticos via ações sinérgicas e antagônicas, comumente conhecidas como sinalização cruzada (Bostock, 2005). Os hormônios, em particular o ABA, juntamente com citoquininas estão envolvidos na sinalização entre a parte aérea e as raízes. Esta longa distância de sinalização pode ser mediada particularmente via ABA, bem como por EROs (Lake *et al.*, 2002).

1.3.1 Sinalização por Ácido abscísico (ABA)

O ABA pertence a uma classe de metabólitos conhecidos como isoprenóides, também chamados de terpenóides. Eles derivam de um precursor comum de cinco carbonos, o isopentenil (IDP) (Nambara & Marion-Poll, 2005). Até alguns anos atrás, pensava-se que todos os isoprenóides eram sintetizados a partir do ácido mevalônico (MVA). Entretanto, uma rota alternativa para a síntese de IDP foi recentemente descoberta, a rota 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) (Dietz *et al.*, 2000). Em plantas superiores, ambas as rotas, MVA e MEP, coexistem. Em contraste, em diversas eubactérias e algas, somente a rota MEP está presente (Nambara & Marion-Poll, 2005). Apesar de o ABA ser

formado por 15 átomos de carbono, em plantas ele não é diretamente derivado de um precursor sesquiterpênico, o farnesildifosfato (FDP). O ABA é preferivelmente formado pela clivagem de um carotenóide C₄₀ originado pela rota MEP (Kasahara *et al.*, 2004).

Os genes que codificam diversas enzimas envolvidas em etapas cruciais da biossíntese de ABA já foram identificados em *Arabidopsis* e diversas outras plantas (Figura 1). Entre eles, podemos citar a zeaxantina-epoxidase (ZEO), a 9-*cis*-epoxicarotenóide-dioxigenase (NCED) e a ácido abscísico-aldeído-oxidase (AAO3) (Nambara & Marion-Poll, 2005). Em *Arabidopsis*, a enzima aldeído-oxidase AAO3 citosólica dependente de molibdênio (Mo) e cobalto (Co) catalisa o último passo na biossíntese de ABA (Seo, 2004). Além disto, o cofator sulfurado MoCo e as aldeído-oxidases contêm dois agrupamentos [2Fe-2S]. Portanto, a atividade das aldeído-oxidases é direta e indiretamente (por meio da biossíntese de MoCo) dependente da maquinaria mitocondrial de montagem de agrupamentos [Fe-S] (Frazzon *et al.*, 2007).

A oxidação do abscísico aldeído a ácido carboxílico é a última etapa da biossíntese de ABA, e é catalisada pela enzima aldeído abscísico-oxidase (AAO). O mutante de *Arabidopsis aao3-1*, que contém a mutação localizada em um dos sítios de *splicing* de um de seus íntrons, apresentou um fenótipo de murcha e uma pequena redução na dormência das sementes em comparação com os mutantes *aba* de *Arabidopsis*. Acredita-se que o fenótipo brando das sementes dos mutantes *aao3-1* deva ser atribuído à redundância gênica, sendo postulado que outras aldeído-oxidases devem estar envolvidas na biossíntese de ABA (Seo *et al.*, 2000). Entretanto, mutantes nulos *aao3* exibiram fenótipos de significativa deficiência de ABA, indicando que a AAO3 é provavelmente a única aldeído-oxidase envolvida na síntese de ABA (Seo *et al.*, 2004). Como referido anteriormente, as aldeído-oxidases requerem um cofator MoCo para suas atividades catalíticas. Interessantemente, mutações nos genes de síntese dos cofatores MoCo também levam à deficiência de ABA (Sagi *et al.*, 2002).

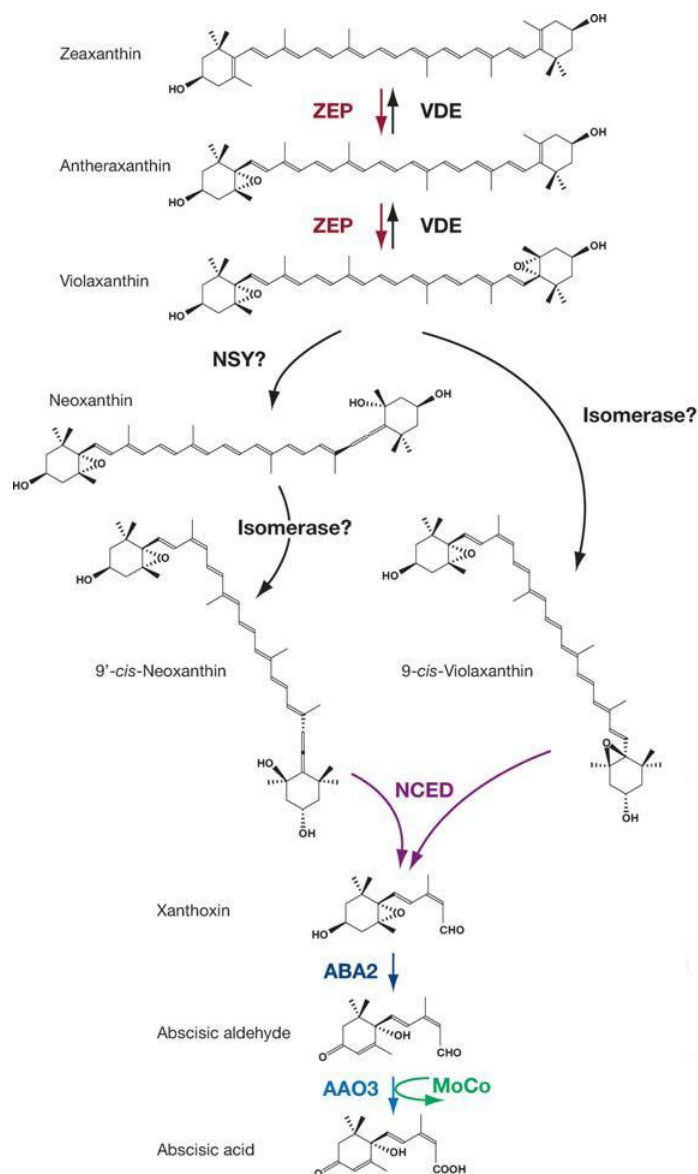


Figura 1: **Rota de biossíntese do ABA.** A síntese da violaxantina é catalizada pela zeaxantina epoxidase (ZEP). A reação inversa que ocorre nos cloroplastos sob condições de luz intensa é catalizada pela enzima violaxantina de-epoxidase (VDE). A formação de isômeros-cis de violaxantina e neoxantina pode requerer duas enzimas, a neoxantina sintase (NSY) e uma isomerase. A clivagem das cis-xantofilas é catalizada por uma família de 9-cis-epoxicarotenóides dioxigenases (NCED). A xantoxina é convertida pela enzima ABA2 em abscísico-aldeído, que é oxidado a ABA por uma abscísico-aldeído oxidase (AAO3). (Adaptado de Nambara & Marion-Poll, 2005).

A regulação do metabolismo de ABA tem sido estudada principalmente em nível transcricional. Este processo é diferencialmente regulado por sinais externos e internos às células. Em particular, as expressões dos genes *NCED3*, *AAO3*, *ABA3* e *ZEP* são induzidas pela desidratação em *Arabidopsis*. As expressões de *ABA2*, *ZEP* e *AAO3*, mas não de *NCED3*, são induzidas pela aplicação de glicose às plantas o que leva ao acúmulo de ABA (Cheng *et al.*, 2002).

Análises genéticas do mutante de *Arabidopsis sad1* (super sensível a ABA e seca) indicam que a síntese de ABA é regulada também pelo nível de estabilidade do mRNA. O locus SAD1 codifica uma proteína multifuncional semelhante ao peptídeo Sm-like snRNP, requerido para o processamento do RNA. O mutante *sad1* apresenta reduzidos níveis de ABA e de ácido faséico (do inglês, “*phaseic acid*” ou PA) e, análises de expressão demonstraram que SAD1 é um regulador positivo de AAO3 e AtABA3 (Nambara & Marion-Poll, 2005). Por meios de análise do gene-repórter codificado pela proteína de fluorescência verde GFP (do inglês, “*green fluorescent protein*”), os genes *NCED2* e *NCED3* em fusão com *gfp* foram expressos em células-guarda de folhas senescentes e cotilédones respectivamente. Além disto, a enzima AAO3 foi induzida em células-guarda sob estresse, sendo também encontrada nas células-guarda em estudos de imunofluorescência e de expressão, utilizando a proteína fusionada ao gene-repórter *gfp* (Koiwai *et al.*, 2004). A expressão de dois genes, *AAO3* e *ABA3* foi aumentada sob estresse osmótico (Xiong *et al.*, 2001).

A principal função do ABA parece ser a regulação do balanço hídrico e da tolerância ao estresse osmótico nas plantas (Koornneef *et al.*, 1998). Entretanto, nenhum receptor potencial que perceba o aumento do acúmulo de ABA foi identificado. Até hoje, foram descritas três proteínas ligadoras de ABA, sendo elas (i) uma proteína nuclear ligadora de RNA, a FCA (do inglês, “*Flowering Time Control I Locus A*”); (ii) uma proteína cloroplastídica denominada subunidade magnésio-protoporfirina-IX da quetalase H (do inglês, “*Magnesium Protoporphyrin-IX Chetalase H subunit*); e (iii) uma proteína G associada à membrana denominada receptor 2 proteína-acoplada (do inglês, “*Protein Coupled Receptor 2*”) (Verslues & Zhu, 2007).

O ABA apresenta um importante papel na regulação das respostas das plantas aos estresses abióticos, no controle da germinação de sementes, no crescimento e na abertura estomática. Experimentos com diversas espécies de plantas indicaram que o acúmulo de ABA um pouco acima dos níveis basais em tecidos de plantas não estressadas é requerido para a promoção de tolerância a estresses abióticos (Nambara & Marion-Poll, 2005). Este acúmulo de ABA deve ser seguido pela sua percepção e subsequente sinalização para ativar as respostas ao estresse reguladas por ABA. Recentemente, foram identificadas duas proteína-fosfatases envolvidas na via de sinalização do ABA, a ABA-insensitiva 1 (do inglês, “*Abscisic Acid Insensitive I*” ou ABI1) e a ABI2 (Verslues, 2007). Particularmente

e interessante é a recente observação de que a ABI2 interage diretamente com a glutathionaperoxidase 3, e esta interação afeta o *status* redox e a atividade de fosfatase de ABI2, provendo uma ligação direta entre a sinalização de ABA e o *status* redox; e a ABI1 interage com o ácido fosfatídico para regular o controle estomático (Miao *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2006).

Os níveis de ABA ativo são negativamente regulados pelas rotas de degradação e de conjugação de ABA com açúcares. Na degradação, o ABA é primeiramente hidroxilado no C-8' produzindo predominantemente 8'-hidroxil-ABA, o qual é subsequente convertido a ácido fáséico (Kushiro *et al.*, 2004). Embora seja evidente que a biossíntese de ABA é responsiva às condições de estresse, torna-se evidente que o catabolismo do ABA é necessário para determinar o nível de resposta às condições ambientais. Os níveis de PA e, ocasionalmente, de ácido diidrofáséico (DPA) aumentam assim como os níveis de ABA (Nambara & Marion-Poll, 2005). Além disso, foi observado em *Arabidopsis* que os níveis de PA continuam a aumentar mesmo quando os níveis de ABA atingem o platô máximo. Entretanto, quando a planta é desidratada e subsequente re-hidratada, os níveis de ABA diminuem e, concomitante, aumentam os níveis de PA (Kushiro *et al.*, 2004). Em contraste com PA e DPA, os níveis de ABA conjugado a açúcares nem sempre variam em paralelo com a mudança nos níveis de ABA, sugerindo que a conjugação é regulada por tecidos e condições particulares (Zeevaart, 1999). Assim, a regulação gênica transcricional e pós-transcricional apresenta papel crucial no acúmulo de ABA em resposta ao estresse osmótico (Nambara & Marion-Poll, 2005).

1.3.2 Sinalização por Quinetina (kin)

As citoquininas foram descobertas na década de 1950 como substâncias que induzem a divisão celular em células vegetais. Elas são uma classe de hormônios vegetais que desempenha diversos papéis no desenvolvimento das plantas, incluindo a dominância apical, a ativação e a formação do meristema vegetativo, a senescência foliar, a mobilização de nutrientes, a germinação de sementes, o crescimento de raízes e a resposta a estresses (Barciszewski *et al.*, 2007). Entre as citoquininas mais estudadas, a quinetina (ou cinetina, do inglês, “*kinetin*” ou kin) retarda a senescência em plantas, o

envelhecimento em células humanas em cultura e o desenvolvimento de insetos, prolongando sua expectativa de vida (Sharma *et al.*, 1997). A kin também estimula a cromatina nuclear de culturas *in vitro* de fibroblastos humanos.

A kin foi identificada em uma solução de DNA de arenque após autoclavagem por Skooge e colaboradores da Universidade de Winsconsin (Estados Unidos), e foi demonstrado se tratar de um derivado de adenina 6-furfurilaminopurina.

A kin é um antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo* (Barciszewski *et al.*, 2007). Entre seus efeitos mais significativos e importantes em células vegetais, foi descrito que a aplicação exógena de kin afeta a transcrição do rRNA catalisada pela RNA-polimerase I (Pol I) de forma promotor-dependente em *Arabidopsis*. Ela estimula a transcrição em células em franca multiplicação e regula negativamente a transcrição em células quiescentes, presumivelmente refletindo a demanda por ribossomos e síntese protéica. A kin estimula a produção de rRNA após 1 hora de tratamento das células vegetais, sendo a Pol I responsável por 34% da transcrição nuclear total em plantas não tratadas e cerca de 60% da transcrição após o tratamento com kin. A resposta específica da Pol I sugere que as citoquininas podem atuar como reguladoras da capacidade de síntese protéica e do *status* de crescimento em células vegetais (Gaudino & Pikaard, 1997). Neste sentido, sabe-se que a kin não afeta a atividade enzimática da anidrase carbônica (CA) e da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) (Çiftçi *et al.*, 2003).

1.4 Agrupamentos [Fe-S]

Cofatores biológicos de ferro e enxofre [Fe-S] foram identificados e caracterizados por espectroscopia e métodos de química analítica há mais de 40 anos como grupos prostéticos ácido-resistentes contidos em uma classe de proteínas carreadoras de elétrons denominadas ferredoxinas (Beinert *et al.*, 1997). Os agrupamentos [Fe-S] estão entre os mais versáteis e antigos cofatores encontrados na natureza. As células têm explorado as propriedades eletrônicas e estruturais desses agrupamentos inorgânicos para uma ampla variedade de atividades incluindo a transferência de elétrons, a catálise e a ativação de substratos. Como resultado, as rotas básicas de energia do metabolismo e os sistemas necessários para o crescimento e o desenvolvimento, a assimilação de nutrientes e a

resposta aos estresses dependem fundamentalmente de proteínas constituídas de agrupamentos [Fe-S] (Frazzon *et al.*, 2007).

A principal função das proteínas Fe-S é a transferência de elétrons por meio de estados oxidados do ferro, Fe^{2+} ou Fe^{3+} . Diferenças nos ligantes ou no ambiente protéico dos agrupamentos [Fe-S] permitem uma ampla faixa de potencial redox, isto é, de -600 a $+400$ mV (Beinert, 2000). Os agrupamentos [Fe-S] também servem como sítios ativos de enzimas catalíticas como, por exemplo, a aconitase que isomeriza citrato a isocitrato. Outro exemplo inclui o grupo de enzimas que possui o radical SAM (do inglês, “*S-adenosyl-L-methionine*”), o qual utiliza o agrupamento [4Fe-4S] para a doação de elétrons, iniciando uma reação radical-dependente, e um agrupamento [2Fe-2S] para a doação de enxofre (Marsh *et al.*, 2004). Além disso, esses agrupamentos podem participar de mecanismos regulatórios, embora esse tipo de função ainda não tenha sido descrito para proteínas Fe-S em plantas (Balk & Lobléaux, 2005). Em bactérias, por outro lado, os agrupamentos [Fe-S] agem como sensores de estresse oxidativo ligados a fatores de transcrição (Beinert & Kiley, 1999).

As proteínas Fe-S mais proeminentes estão presentes nos complexos I, II e III da cadeia respiratória de bactérias; no fotossistema I e na ferredoxina da fotossíntese; na nitrogenase de bactérias azotórficas; na aconitase e no ciclo de Krebs; na proteína reguladora de ferro 1 (do inglês, “*iron regulating protein 1*” ou IRP1), envolvida na regulação da absorção de ferro em mamíferos. Assim, as proteínas Fe-S são fundamentais na transferência de elétrons no complexo respiratório mitocondrial e no aparato fotossintético dos cloroplastos. Além disso, esses agrupamentos são cofatores para as enzimas nitrito- e sulfito-redutases envolvidas, respectivamente, na assimilação de nitrogênio e enxofre, nos cloroplastos (Imsande, 1999). Esta diversidade funcional das proteínas Fe-S certamente é reflexo da versatilidade química desses agrupamentos, o que sugere a importância dos agrupamentos [Fe-S] no surgimento da vida pré-biótica na Terra (Wächtershäuser, 1992).

Embora os agrupamentos [Fe-S] possam ser formados espontaneamente *in vitro*, a toxicidade do ferro e do enxofre exige mecanismos para a montagem dos agrupamentos e a inserção dos mesmos em apoproteínas. Esses mecanismos apresentam uma origem evolucionária ancestral e permanecem essenciais e altamente conservados em todas as células vivas (Frazzon & Dean, 2003). Ao longo da evolução, os agrupamentos [Fe-S]

tornaram-se parte integral de diversos processos biológicos incluindo a conversão de energia e a regulação da expressão gênica (Yang *et al.*, 2006).

1.4.1 Estrutura e sistemas de biossíntese dos agrupamentos [Fe-S]

Os agrupamentos [Fe-S] mais simples são os que possuem um centro rômico [2Fe-2S]. A duplicação deste centro forma agrupamentos [4Fe-4S] bastante comuns, os quais possuem uma estrutura em forma de cubo com átomos de ferro e de enxofre em alternância nos cantos do cubo (Lill & Mühlhoff, 2006). A ligação dos agrupamentos [Fe-S] a cadeias polipeptídicas ocorre por meio da coordenação de íons de ferro, positivamente carregados por doadores de elétrons fornecidos por diversas cadeias laterais de aminoácidos. O exemplo mais típico é o enxofre de resíduos de cisteína. Existem algumas exceções que incluem as proteínas Rieske, em que os agrupamentos [2Fe-2S] se ligam a duas cisteínas e a duas histidinas.

Existem proteínas Fe-S nas quais o agrupamento não contém somente ferro como metal. A proteína nitrogenase MoFe contém um agrupamento chamado de cofator MoFe, formado por [7Fe-9S-Mo] (Einsle *et al.*, 2002). Esta proteína também serve de exemplo para proteínas que utilizam mais de um tipo de agrupamento. Apesar da aparente diversidade na estrutura global, reatividade e propriedades eletrônicas dos agrupamentos [Fe-S], os polinucleares partilham uma característica estrutural comum: são construídos a partir de [2Fe - 2S] (Frazzon & Dean, 2003).

Um grande número de proteínas está envolvido na biogênese dos agrupamentos [Fe-S], e esse processo pode ser dividido em três etapas principais: (i) formação do enxofre elementar, (ii) montagem do agrupamento [Fe-S], e (iii) inserção do agrupamento em apoproteínas (Balk & Lill, 2004). As bactérias desenvolveram pelo menos três sistemas de biossíntese, altamente conservados, que estão envolvidos na formação de proteínas Fe-S (Lill & Mühlhoff, 2006).

O sistema de fixação de nitrogênio, NIF (do inglês, “*Nitrogen Fixation System*”) foi o primeiro a ser descoberto e refere-se à montagem de agrupamentos [Fe-S] da nitrogenase. Esta enzima é responsável pela conversão de nitrogênio molecular (N₂) em amônia (NH₃) nas bactérias fixadoras de nitrogênio (Frazzon *et al.*, 2002). A identificação inicial de proteínas envolvidas na montagem de agrupamentos [Fe-S] foi feita a partir de

análises genéticas e bioquímicas de proteínas especificamente requeridas para a fixação de nitrogênio em *Azotobacter vinelandii* (Frazzon & Dean, 2003).

A enzima nitrogenase é composta por dois componentes protéicos, a MoFe proteína, a qual contém o sítio de ligação e redução do substrato, e a Fe-proteína, a qual serve como uma fonte específica de elétrons requeridos para a redução do substrato. A MoFe-proteína contém dois tipos de cofator, o cofator FeMoCo e o cofator P [8Fe-7S], e a Fe-proteína contém um único cofator [4Fe-4S]. Caracterizações bioquímicas de linhagens mutantes de *A. vinelandii* inativadas individualmente para cada um dos dois genes específicos da fixação de nitrogênio, designados genes *nifU* e *nifS*, mostraram que esses mutantes apresentam significativa baixa de atividade tanto para a Fe-proteína como para a MoFe-proteína (Jacobson *et al.*, 1989). Essa característica é diferente do efeito de mutações em outros genes da fixação de nitrogênio, os quais tipicamente resultam em uma alteração na atividade da Fe-proteína ou da MoFe-proteína. Devido a essa propriedade, comum tanto à MoFe-proteína como à Fe-proteína, de conterem o cofator [Fe-S], foi analisada a possibilidade de NifS e NifU terem funções complementares relacionados à formação do cofator [Fe-S].

Estudos posteriores demonstraram que a NifS é uma enzima dependente de piridoxal-fosfato que catalisa a desulfurização da L-cisteína (Zheng *et al.*, 1993). Evidências bioquímicas disponibilizaram o mecanismo de ação da enzima NifS que inicialmente envolve a formação do substrato cisteína/piridoxal-fostato. Subseqüentemente ocorre um ataque nucleofílico no enxofre da cisteína pelo ânion tiolato de um resíduo de cisteína do sítio ativo de NifS, o que resulta na formação de uma ligação persulfito. Esta ligação da enzima ao persulfito é proposta por ser a forma ativa do enxofre que é usado para a associação do cofator [Fe-S] (Zheng *et al.*, 1994).

O aspecto atrativo desse mecanismo para a mobilização do enxofre é que ele previne a formação de sulfito livre, o qual é um veneno metabólico, durante o processo de associação. A proteína NifS representa um membro de uma classe de enzimas que têm atividade cisteína-desulfurase (Kaiser *et al.*, 2000). Como a NifS foi identificada como a provável doadora de enxofre para a formação do cofator [Fe-S] da nitrogenase, NifU se tornou um alvo potencial complementar que poderia servir como uma fonte de ferro e/ou servir como o arcabouço para associação do cofator [Fe-S]. Análises da seqüência primária da proteína NifU indicaram a possibilidade desta em associar o cofator [Fe-S], uma vez

que esta apresenta 9 resíduos de cisteínas conservadas. A purificação da enzima demonstrou que NifU é um homodímero que contém um cofator [Fe-S] com atividade redox por subunidade em sua forma isolada. Inicialmente, esses cofatores foram considerados como potenciais precursores do cofator [Fe-S] da nitrogenase. No entanto, a impossibilidade de ser liberado pelo tratamento com agentes quelantes descartou esta hipótese (Fu *et al.*, 1994).

Experimentos subseqüentes demonstraram que um segundo cofator é reunido em NifU quando este é incubado com NifS, Fe²⁺ e L-cisteína. Desta maneira, foi determinado que o cofator isolado junto com a proteína está permanentemente ligado a ela e que o segundo cofator, designado cofator transiente, pode ser liberado da proteína. A região central de NifU contém 4 resíduos de cisteína onde está ligado o cofator permanente e, na região N-terminal, 3 resíduos de cisteína sustentam a associação do cofator transiente (Yuvaniyama *et al.*, 2000; Agar *et al.*, 2000). No entanto, cofatores [Fe-S] de alta nuclearidade têm sido descritos e nem todos estão associados a suas proteínas relacionados pelas cisteínas ligantes. Na verdade, estas variações de espaçamento, meio ambiente e tipo de ligantes do cofator [Fe-S] encontrados em diferentes proteínas Fe-S são uma significativa contribuição para a ampla taxa de propriedades químicas e eletrônicas dos cofatores [Fe-S] associados (Einsle *et al.*, 2002). Todavia, existe uma assinatura de seqüência polipeptídica que pode ser usada para prever se uma proteína em particular conterá ou não o cofator [Fe-S].

A proteína NifU em *A. vinelandii* funciona como arcabouço para a montagem de agrupamentos [Fe-S] na nitrogenase. O domínio N-terminal de NifU apresenta similaridade de seqüência com a proteína IscU de bactérias e as proteínas Isu1 e Isu2 de leveduras. O domínio C-terminal de NifU tem similaridade de seqüência com Nfu1 de leveduras e com proteínas NFU de plantas (Balk & Lobréaux, 2005).

O segundo sistema designado ISC (do inglês, “*Iron-Sulfur Cluster*”), é necessário para a geração da maioria das proteínas Fe-S celulares e tem função biossintética endógena em bactérias (Zheng *et al.*, 1998). Os componentes desta maquinaria são similares às proteínas de montagem desses agrupamentos em bactérias e, aparentemente, essa maquinaria foi herdada da mitocôndria de um ancestral procariótico. A maquinaria mitocondrial ISC é essencial para a montagem dos agrupamentos no citoplasma e núcleo (Kispal *et al.*, 1999).

Os genes *isc* são comumente encontrados em bactérias, e frequentemente referidos como genes endógenos para a montagem de agrupamentos [Fe-S]. As proteínas-arcabouço funcionam como homodímeros e contêm três (IscU/ISU; IscA/ISA) ou dois (Nfu) domínios conservados de cisteínas para a coordenação do agrupamento [Fe-S] transitente. Além de doador de enxofre e proteínas-arcabouço, os genes *isc* codificam uma ferredoxina e duas chaperonas, a Hsp70, HscA e sua co-chaperona HscB (Balk & Lobréaux, 2005). A purificação de uma segunda enzima com atividade de desulfurase em *A. vinelandii* levou à identificação do gene *iscS* que por sua vez é parte do grupo de genes, *iscSUA-hscBA-fdx* (Zheng *et al.*, 1998).

Para a montagem das proteínas Fe-S fora da organela, a mitocôndria desenvolveu uma rota de exportação que utiliza transportadores ABC que parecem ser específicos para eucariotos (Lill & Mühlenhoff, 2006). Os componentes da maquinaria CIA (do inglês, “*Cytosolic Iron-Sulfur Protein Assembly Machinery*”) incluem duas P-loop NTPases e proteínas Fe-S que apresentam similaridade com hidrogenases de bactérias e algas. Além disso, a biossíntese de proteínas Fe-S citosólicas e nucleares dependem da maquinaria de montagem mitocondrial ISC (Lill & Mühlenhoff, 2006). As organelas parecem exportar um componente para o citoplasma que é essencial para a maturação de proteínas Fe-S extra-mitocondriais. O principal componente desta maquinaria ISC de exportação é um transportador mitocondrial de ligação de ATP, pertencente à família ABC (Kispal *et al.*, 1999).

O terceiro sistema de montagem é chamado de SUF (do inglês, “*Sulfur Mobilization*”), e apresenta papel similar ao do sistema ISC, mas opera principalmente sob condições de estresse, como, por exemplo, a limitação de ferro e o estresse oxidativo (Takahashi & Tokumoto, 2002; Fontecave & Ollagnier-de-Choudens, 2005). Sequências semelhantes às desse sistema são encontradas nos plastídeos de plantas e algas, onde as mesmas apresentam papel crucial na biossíntese de proteínas Fe-S do aparato fotossintético (Balk & Lobréaux, 2005). Esse sistema foi herdado de cianobactérias, os ancestrais dos plastídeos (Takahashi & Tokumoto, 2002).

Um conjunto de genes *suf* se encontra em cianobactérias e plantas, mas está ausente em fungos e metazoa (Loiseau *et al.*, 2003). A deleção do grupo de genes *isc* não é letal em *Escherichia coli* porque as suas funções podem ser parcialmente complementadas pelo

operon *suf* (inicialmente por estar envolvido na mobilização de enxofre) que é formado por seis genes denominados *sufABCDSE* (Takahashi & Tokumoto, 2002).

As ferredoxinas compõem o maior grupo de proteínas Fe-S para a transferência de elétrons e contém uma grande variedade de agrupamentos [Fe-S]. Os agrupamentos [2Fe-2S] são encontrados nos cloroplastos e as ferredoxinas atuam como doadoras de elétrons para enzimas como, por exemplo, a nitrito-redutase e a glutamato-sintase (Knaff & Hirasawa, 1991). Além disso, em diversos tecidos animais as ferredoxina atuam como doadoras de elétrons para o citocromo P450 (Nemani *et al.*, 1989).

1.4.2 Proteínas Fe-S em plantas

Aproximadamente 100 proteínas de plantas utilizam os agrupamentos [Fe-S] como cofatores e foi estimado que 2% do enxofre de vegetais é, de fato, encontrado nos agrupamentos [Fe-S] (Kessler & Papenbrock, 2005). Todas as rotas básicas de metabolismo de energia em plantas dependem diretamente da função de proteínas Fe-S. Nesta seção serão apresentados alguns exemplos de proteínas Fe-S fundamentais e exclusivas de vegetais.

As proteínas Fe-S do cloroplasto estão envolvidas em vias metabólicas essenciais tais como a fotossíntese, a assimilação de nitrogênio e enxofre, a importação de proteínas e a transformação de clorofila (Ye *et al.*, 2006). Uma grande concentração de ferro é encontrada dentro dos cloroplastos, onde estão presentes proteínas fotossintéticas heme e nas proteínas Fe-S responsáveis pela cadeia de transporte de elétrons (Raven *et al.*, 1999).

É provável que a condição redox nos cloroplastos seja particularmente difícil para a síntese e manutenção das proteínas de montagem dos agrupamentos [Fe-S], visto que estes agrupamentos são muito sensíveis ao oxigênio, o qual é produto da fotossíntese (Beinert *et al.*, 1997). Portanto, os cloroplastos devem possuir mecanismos únicos para a montagem dos agrupamentos sob condições oxidantes e/ou mecanismos de substituição ou reparação de agrupamentos danificados pela oxidação (Murthy *et al.*, 2007).

O fotossistema I (PSI) apresenta três proteínas que utilizam os agrupamentos [Fe-S] e o fotossistema II (PSII) contém o complexo da citocromo b6/f que possui uma proteína Fe-S associada. Várias outras proteínas [Fe-S] estão associadas com a membrana do envelope externo e interno dos cloroplastos e estudos realizados revelaram que a

estabilidade e a atividade de PSI e PSII são dependentes de agrupamentos [Fe-S]. A inativação do agrupamento [Fe-S] em PSI e PSII parece ser a primeira causa de fotoinativação (Imsande, 1999; Suh *et al.*, 2000). Esse fenômeno é causado pelo excesso de luz sobre o PSII e pelo estresse do PSI determinado por temperaturas baixas ou pela seca (Rathinasabapathi *et al.*, 1997). A transferência de elétrons do PSI pela ferredoxina/tiorredoxina dos cloroplastos é utilizada para regular a atividade de outras proteínas por meio da redução das pontes dissulfido. Este sistema medeia a atividade de três enzimas do ciclo de Calvin e a inativação da primeira enzima da rota da pentose-fosfato em resposta à luz (Imsande, 1999).

As enzimas glutamina fosforribosil-pirofosfato-amidotransferase (Kim *et al.*, 1995), ácido dihidroxidesidratase (Flint & Emptage, 1998) e a aldeído-oxidase, envolvidas nos últimos passos da biossíntese do ácido 3-indolacético (IAA) e do ABA são todas dependentes dos agrupamentos [Fe-S] (Sekimoto *et al.*, 1997).

Estudos sugerem que a clorose das folhas causada por deficiência de nitrogênio, ferro e enxofre pode estar associada a defeitos nos agrupamentos [Fe-S] nas enzimas nitrato-redutase (citoplasmática), nitrito-redutase (plastídica) e glutamato-sintetase, responsáveis pela redução e assimilação do íon amônio (Imsande, 1999).

Os componentes da membrana externa do envelope plastídico, responsáveis pela importação protéica, são designados complexo Toc; já os componentes da membrana interna são denominados complexo Tic. A proteína Tic55 possui um agrupamento tipo Rieske (2Cys-Fe-2S-Fe-2His) e um sítio mononuclear para ligação ao ferro. Devido à presença desse agrupamento [2Fe-2S], a Tic55 pode ser considerada um regulador da translocação do envelope interno (Caliebe *et al.*, 1997).

O genoma de *Arabidopsis* possui genes que codificam duas cisteína-dessulfurases, NFS1 e NFS2. A proteína recombinante purificada NFS2 (CpNifS- Cp do inglês, “*chloroplastidic*”) catalisa a desulfuração de cisteína à alanina e é piridoxal-5'-fosfato-dependente e foi caracterizada como uma proteína plastídial (Kushnir *et al.*, 2001). O silenciamento de CpNifS impede o transporte de elétrons na fotossíntese, a assimilação de enxofre e nitrogênio e a fixação de carbono (Murthy *et al.*, 2007).

A atividade de cisteína-desulfurase de SufS de *E. coli* é reforçada até oito vezes na presença de SufE. Pesquisas em banco de dados revelaram a existência de um homólogo de *sufE* no genoma de *Arabidopsis* possivelmente localizado no genoma plastídial (Loiseau

et al., 2003). Esses dados levaram à hipótese de que um mecanismo *SUF-like* de metabolismo Fe-S é conservado em cloroplastos. Em *E. coli*, o operon *sufABCDSE* é exigido sob condições ferro-limitantes e de estresse oxidativo, sugerindo que a maquinaria SUF tem uma menor sensibilidade ao oxigênio (Nachin *et al.*, 2001). Além da proteína SufE, o genoma de *Arabidopsis* codifica outras duas proteínas com domínios SufE, a SufE2 e a SufE3. Foi demonstrado que a proteína recombinante SufE2 purificada ativa a atividade de cisteína-desulfurase de CpNifS em 40 vezes. A expressão de SufE2 foi flor-específica e alta em pólen. SufE3, também uma proteína plastídica, foi expressa em níveis baixos em todos os principais órgãos vegetais. As plantas possuem três ativadores de mobilização de enxofre por CpNifS e se espera que alguns desses possam se complementar mutuamente. Ainda assim, o fenótipo embrio-letal de mutantes de *Arabidopsis knockouts* para SufE1 e SufE3 indica que eles não podem se complementar. SufE1 não pode complementar SufE3 porque não tem atividade de quinolinato-sintase. SufE2 não pode complementar a perda de SufE1 nos tecidos vegetais porque é somente expresso no pólen (Murthy *et al.*, 2007).

As proteínas SUF não representam todas as proteínas envolvidas no metabolismo Fe-S em plastídios. Foram descritos em *Arabidopsis* cinco genes *NFU*, três deles codificam proteínas localizadas nos cloroplastos e duas em mitocôndrias (Yabe *et al.*, 2004).

Uma das duas proteínas NifS codificadas no genoma nuclear de *Arabidopsis* está localizada na mitocôndria. A presença de um transportador ABC mitocondrial similar a Atm1p de leveduras indica que as mitocôndrias vegetais podem servir como fonte de agrupamentos [Fe-S] para proteínas extra mitocondriais. O transportador STA1, que é um transportador ABC em plantas, tem a função de maturar as proteínas Fe-S do citosol (Kushnir *et al.*, 2001).

Existem provas suficientes para afirmar que ambos, plastídios e mitocôndrias são capazes de montar suas próprias proteínas Fe-S. Esta é uma importante função dessas organelas que se tornou evidente a partir de recentes relatos sobre organismos "primitivos" que tenham perdido a capacidade de fotossíntese ou respiração. A montagem de agrupamentos [Fe-S] é uma função endossimbiótica e essencial para as células eucarióticas (Kispal *et al.*, 2005).

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo Geral

Caracterizar genes envolvidos na formação dos cofatores [Fe-S] em *Eucalyptus grandis* por meio da análise de expressão gênica e observar a relação destes com a resposta a estresse(s) abiótico(s) e outros sinais.

1.5.1.1 Objetivos específicos

- Determinar os genes envolvidos na síntese de cofatores [Fe-S] por meio da homologia de seqüências disponíveis de nucleotídeos de bactérias, leveduras e plantas, usando como modelo os 34 genes já caracterizados em *A. thaliana*;
- Caracterizar os genes *NFS1*, *ISUI* e *ISAI* envolvidos na síntese do agrupamento [Fe-S] segundo seu nível de transcrição pelo método de PCR em Tempo Real em diferentes condições de estresses aplicados a plântulas de *E. grandis*.

CAPÍTULO II

Transcriptional analysis of the *Eucalyptus grandis* *NFS1*, *ISU1* and *ISA1* genes under stress

Transcriptional analysis of the *Eucalyptus grandis* NFS1, ISU1 and ISA1 genes under stress

Corresponding author.

Address: Avenida Bento Gonçalves, 9500, Federal University of Rio Grande do Sul, Biotechnology Center, Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone number: 55-51-33086072

Fax number: 55-51-33087309

E-mail address: jeverson.frazzon@ufrgs.br

Subject areas (2) environmental and stress responses

Number of black and white figures, color figures and tables.

Black and white: 4

Color: 0

Tables: 0

Authors:

Luisa Abruzzi de Oliveira, Ana Paula Frazzon, Michèle Claire Breton, Rosele Rocho, Ana Paula Körbes, Rogério Margis, Giancarlo Pasquali and Jeverson Frazzon

Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Abbreviations

[Fe-S]- iron-sulfur

ABA- abscisic acid

ANA- 1-naphthaleneacetic acid

AO- aldehyde oxidase

APX- ascorbate peroxidase

CAT- catalase

Cy3- cyanine 3

EST- expressed sequence tag

GR- glutathione reductase

His- histone H2B

ISC- iron sulfur cluster

Kin- kinetin

MoCo- molybdenum co-factor

Rib- ribonucleoprotein L23A

SAM- S-adenosyl-L-methionine

SOD- superoxide dismutase

Abstract

Iron-sulfur [Fe-S] clusters are prosthetic groups required to maintain life processes including respiration, photosynthesis, metabolic reactions, sensing, signaling and, gene regulation. In plants the biogenesis of Fe-S protein is compartmentalized and adapted to specific needs of the eukaryotic and photosynthetic cell. Many environmental factors affect plant development and limit the productivity and the geographical distribution. Among them, *Eucalyptus grandis* is an important economical tree widely cultivate in subtropical regions which suffers under low temperature stress. Here we describe a transcriptional analysis of the *E. grandis NFS1*, *ISU1* and *ISAI*, three genes involved in the biogenesis of [Fe-S] clusters. Microarrays analyses were carried out and leaves from *E. grandis* demonstrated higher expression of these genes than xylem. *EgrISU1* had a constitutive expression, but the expression pattern was higher than in *E. globulus* xylem. Differences were observed in the relative gene expression profile when we compared the xylem of the two *Eucalyptus* species, suggesting that these genes may be implicated in the contrasting phenotypic characteristics of wood from *E. globulus* and *E. grandis*. The response of these genes to a series of hormonal and stress signals over *E. grandis* seedlings was also evaluated by *qRT-PCR*. After chilling treatment of seedlings, *EgrNFS1* and *EgrISU1* showed 6 to 8-fold and 0.6 to 1.7-fold increase respectively; and *EgrISAI* exhibited a drastic 69 to 114-fold increase. These results suggest that *EgrNFS1* and *EgrISAI* are genes related to the cellular responses against chilling stress, probably to increase sulfur metabolism or to induce antioxidative enzymes.

Keywords: [Fe-S] clusters; *Eucalyptus grandis*; *Eucalyptus globulus*; abiotic stresses

Introduction

Iron sulfur (Fe-S) clusters are versatile biological modules that can be found in nearly all living organisms (Mühlenhoff and Lill, 2000). They are prosthetic groups required to maintain fundamental life processes, where they are involved in numerous enzymatic reactions including electron transfer during photosynthesis, respiration and nitrogen fixation, metabolic reactions of the Calvin and Krebs cycles, but also in sensing, signalling and regulation of gene expression. Plant cells carry, through photosynthesis and respiration, two distinct processes that require significant amounts of Fe-S proteins. Plants are unique in the way Fe-S protein biogenesis is compartmentalized and adapted to specific needs of the eukaryotic and photosynthetic cell. The most prominent Fe-S proteins are those of complexes I, II and III of bacterial and mitochondrial respiratory chains; photosystem I and ferredoxin of photosynthesis; nitrogenase of azototrophic bacteria and aconitase of the Krebs cycle (see reviews Balk and Lobréaux, 2005; Lill and Mühlenhoff, 2005, 2008). Recent findings demonstrated that in yeast, mitochondria are the primary site of [Fe-S] cluster formation, and mitochondria not only produce their own set of Fe-S proteins but, importantly, are also required for the maturation of cytosolic Fe-S proteins (Kushnir *et al.*, 2001).

The primary function of mitochondria is cellular energy supply, but they also fulfill a variety of other metabolic tasks such as the urea cycle and the biosynthesis of heme and amino acids. A new biosynthetic function of mitochondria has been added to this list, namely the maturation of extra-mitochondrial Fe-S proteins (Kushnir *et al.*, 2001). As a result, the basic energy metabolism pathways and systems required for growth and development, the assimilation of nutrients, and the response to stress depend on Fe-S proteins (Frazzon *et al.*, 2007). For the synthesis of [Fe-S] clusters, mitochondria use a complex protein toolbox which is termed “iron sulfur cluster (ISC) assembly machinery” primarily described in *Azotobacter vinelandii* (Zheng *et al.*, 1998). The machinery of [Fe-S] cluster biogenesis is represented by at least three distinct, yet structurally and functionally related systems, designated NIF, ISC and SUF (Johnson *et al.*, 2005). While the NIF system is required to nitrogen-fixing bacteria, the ISC system represents the housekeeping system for Fe-S protein maturation in most living cells. The SUF system is involved in sulfur mobilization, occurs in numerous bacteria, in archaea, and in plant

chloroplasts, but is absent from fungi and metazoa (Loiseau *et al.*, 2003). NFS and NifS-like enzymes are present in almost all organisms and fulfill their main functions during [Fe-S] cluster synthesis. Accordingly, they have a cysteine desulfurase activity that is required for the mobilization of sulfur from L-cysteine by simultaneous release of L-alanine (Zheng *et al.*, 1993; Zheng and Dean, 1994). The ISC system also encodes ISU1 and ISA1 denominated as scaffold proteins and responsible for [Fe-S] cluster assembly and delivery to target proteins. IscU (ISU1) is a truncated version of NifU, containing only the N-terminal transient-cluster binding domain well-known in NifU. The sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters was demonstrated to occur in IscU scaffold protein. Both, the [2Fe-2S]²⁺ and [4Fe-4S]²⁺ clusters in this protein are reductively labile and are degraded (Agar *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2006). IscA-type proteins provide an alternative scaffold for cluster assembly or/and are involved in Fe binding. The existence of three conserved cysteine residues in all IscA proteins propose that both cluster types are subunit bridging. (Krebs *et al.*, 2001; Uнциулеа, M. *et al.*, 2007).

Plant growth and productivity is adversely affected by nature's wrath in the form of various abiotic and biotic stresses. Various anthropogenic activities have accentuated such existing stress factors. Abiotic stress in fact is the principal cause of crop failure worldwide, dipping average yields for most major crops by more than 50% (Mahajan and Tuteja, 2005). The most crucial function of plant cell is to respond to stress by developing defense mechanisms. These proteins may play a role in signal transduction, anti-oxidative defense, anti-freezing, heat shock, metal binding, anti-pathogenesis or osmolyte synthesis (Qureshi *et al.*, 2007). To overcome these limitations and improve production efficiency in the face of a burgeoning world population, more stress tolerant crops must be developed (Khush, 1999).

Cold, drought, and high salinity, which all cause dehydration damage to the plant cell, are the most common environmental stresses that influence plant growth and development, limiting productivity in cultivated areas worldwide (Kayal *et al.*, 2006). Plants have developed a range of defense mechanisms in response to environmental stresses, among them a network of enzymes involved in the detoxification of excess reactive oxygen species which accumulate during an imbalance of cellular homeostasis (Amme *et al.*, 2006). Among woody angiosperms, the most common strategy for surviving freezing is deciduousness, accompanied by winter dormancy (Cavender-Bares, 2007). Due

to its fast growth and fiber quality, *Eucalyptus* is the most commonly planted hardwood in the world, in particular for paper making. However, although widely distributed, its extension is mostly restricted to southern areas because of freezing sensitivity (Kayal *et al.*, 2006). *Eucalyptus*, as well as many other plant species, develops increased freezing tolerance in response to low but nonfreezing temperatures. This adaptive response, known as cold acclimation, takes place on the time scale of days or weeks as a result of a combination of physiological and metabolic changes depending on transcriptome modifications (Thomashow, 1999).

Previous studies have shown that cold-acclimation involves a series of morphological and biochemical changes in leaves and other organs that increase freezing tolerance of plants adapted to temperate climates (Ball *et al.*, 2004). The root chilling of *Eucalyptus regnans* changed the water potential gradient, indicating that root conductance was reduced by only the increased viscosity of water during chilling (Brodrribb and Hill, 2000). Cold-responsive genes encoding molecular chaperones including a spinach *hsp70* gene and a *Brassica napus hsp90* gene (Krishna *et al.*; 1995) may contribute to freezing tolerance by stabilizing proteins against freeze-induced denaturation. *In vivo* and *in organellar* experiments indicate that the *hsp70* Ssq1 and the J-protein Jac1 function together to assist in the biogenesis of (Fe-S) centers in the mitochondrial matrix (Dutkiewicz *et al.*, 2003).

The aim of the present study was to determine the transcriptional regulation of the *E. grandis NFS1*, *ISU1* and *ISA1* genes, three key genes involved in the biogenesis of [Fe-S] clusters under stress condition.

Results

Phylogenetic analysis of *NFS1*, *ISU1* and *ISA1*

A comparative amino acid analysis of three Fe-S cluster genes showed that conserved sequence varied from 47 to 97% among the different species of plants, animals and bacterial encoding sequences. *ISU1* presented a higher degree of conserved amino acid residues than *ISA1*, independently of the pairwise comparison had been made between monocot and dicots, animal and plants or plants and bacteria.

Phylogenetic analyses were made with each Fe-S cluster protein in separate. In NFS1 phylogenetic analysis, bacteria, Vertebrata and Viridiplantae produced three independent clusters, supported by high bootstrap values. The analysis showed that *EgrNFS1* clustered within the group of dicot sequences formed by *Arabidopsis* and *Vitis* (Figure 1A). ISA1 phylogenetic tree present two main clusters, corresponding to mammals and Viridiplantae proteins, with gram-negative bacteria placed in a basal position. ISA1 from Viridiplantae formed a main cluster, where Chlorophyta has a basal position in respect to the Tracheophyta branch, where monocots and dicots form two separated clusters, but without distinction among the dicot members (Figure 1B). ISU1 phylogenetic tree, as observed for NFS1, has three distinct branches corresponding to gram-negative bacteria, mammals and Viridiplantae. As expected *EgrISU1* clustered with Viridiplantae group, where dicot and monocot sequences were not effectively discriminated (Figure 1C).

Microarray analysis of [Fe-S] cluster assembly genes in *Eucalyptus*

In order to gain a better understanding of the genes coding for [Fe-S] cluster assembly proteins in *E. grandis*, total RNA was extracted from mature leaves and xylem tissues of field-grown trees. Total RNA was converted into cDNA and submitted to microarray analysis with 50-mer oligonucleotide chips containing 21,442 unique sequences from *Eucalyptus*. Our microarray results allowed us to observe that leaves from *E. grandis* exhibited higher expression of *NFS1*, *ISA1* and *SufA* than xylem from the same species, and these differences in expression pattern were significant (Figure 2). As shown in Figure 3, *EgrISU1* demonstrated a more or less constitutive pattern of expression in both tissues. The expression of *SufA*, a plastidic gene, showed a differential expression between leaves and xylem of *E. grandis*. As expected, due to higher activity of chloroplasts in leaf tissues, expression of *SufA* was higher in leaves than in xylem.

Another set of microarray analysis was conducted to evaluate differences between xylems from *E. grandis* and *E. globulus*, one of the *Eucalyptus* species with the best standards of wood for cellulose pulping. For *EgrNFS1* gene, the expression was higher in *E. globulus* xylem than in the same tissue from *E. grandis* (Figure 3). Otherwise, *SufA*, *EgrISU1* and *EgrISA1* genes, exhibited a slight increase in expression in xylem tissues from *E. grandis*.

Quantitative reverse transcription-PCR

Considering the importance of the role of Fe-S protein in so many physiological responses and processes in plant cells, we evaluated the pattern of mRNA accumulation in *E. grandis* seedlings after a series of treatments including hormonal and abiotic signals. A quantitative approach based on real-time RT-PCR was employed to estimate the mRNA levels for *E. grandis NFS1*, *ISU1* and *ISAI* in comparison with two generally-assumed constitutive genes: histone H2B (Hays and Skinner, 2001; Sterky *et al.*, 2004) and ribonucleoprotein L23A (Mrusek *et al.*, 2005). Considering the normalization of *EgrNFS1*, *EgrISU1* and *EgrISAI* expression against the constitutive genes His and Rib separately when 4-month-old. *E. grandis* seedlings were exposed to the chilling stress; *EgrNFS1* showed an expression increase of 7 and 9 fold, respectively, and *EgrISAI* a drastic increase of 69 and 114 fold, respectively (Figure 4). *EgrISU1*, in contrast, exhibited a much milder increase in expression when compared to the control plants, with a 1.2-fold higher expression. Hormone-like signals changed the expression level of *EgrISAI* and *EgrNFS1*. Treatment with ABA increased the expression of *EgrISAI* and *EgrNFS1* genes in 79-fold and 4-fold respectively when normalized with ribonucleoprotein L23A and 76-fold and 2-fold when normalized with histone H2B. The kin also increased the expression of these genes in 26-fold (*EgrISAI*) and 2-fold (*EgrNFS1*) when normalized with ribonucleoprotein (Figure 4). All the other treatments tested including NAA, NaCl and drought did not affect the expression of *E. grandis NFS1*, *ISU1* and *ISAI* genes in such a remarkable way as chilling.

Discussion

The present results suggest that the *EgrNFS1* and *EgrISAI* genes may be related to the *E. grandis* cellular response to chilling stress, probably due to increases in the sulfur metabolism and to the induction of antioxidative enzymes. Sulfur-containing defense compounds (SDCs) are crucial for the survival of plants under biotic and abiotic stress (Rausch, 2005). It has been shown that sulfur metabolism mediate the modulation of plant response to various abiotic stress factors (Biswal *et al.*, 2008). Moreover, oxidative,

pathogen infection and heavy metal stresses appear to increase the sulfur demand, as these stresses enhance the expression of sulfate transporters and enzymes of the assimilatory pathway (Hawkesford and Kok, 2006). All together about 100 plant proteins contain [Fe-S] clusters and it was estimated that about 2% of the bound sulfur can be found in [Fe-S] clusters (Kessler and Papenbrock, 2005). Observations of several plant species have led to the addition of elemental sulfur, S⁰, to the list of SDCs (Williams and Cooper, 2004). Possibly the supply of this compound is regulated by the catalytic activity of *EgrNFS1*.

Abscisic acid (ABA) is known to be closely related to stresses and normal physiological conditions in plants where water deficiency or dehydration occurs like drought, freezing, chilling, salinity and fruit/seed maturation (Zhu, 2002; Nambara and Marion-Pool, 2005). Therefore, our first assumption about the induction of *ISAI* and *NFS1* genes in *E. grandis* seedlings after ABA treatment was that such hormone is signaling plants to respond to water deficiency in order to alter or adapt their metabolisms. Also to the initial processes of ABA signal transduction, it promotes changes in gene expression. It has been demonstrated that ABA regulates the expression of many genes under certain stress conditions, including genes that encode proteases, chaperones, enzymes in the metabolism of sugars or other solutes (Taiz and Zeiger, 2004).

It has been documented that signaling of ABA can result in the increased generation of active oxygen species, which in turn induce the expression of antioxidant genes encoding superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and enhance the activities of antioxidant enzymes such as SOD, CAT, ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) (Ünyayar and Çekiç, 2005). The activity of antioxidative enzymes like CAT, APX, SOD and GR have also been shown to be increased after chilling stress (Kuk *et al.*, 2003). Thus, the expression of *EgrISAI* and *EgrNFS1* may be increased for the assembly of clusters for antioxidative enzymes.

While we cannot prove that the observed higher accumulation of the mRNAs was entirely due to increases in the respective gene transcriptions, the up-regulation of the *EgrISAI* and *EgrNFS1* genes could be directly correlated to increases in [Fe-S] cluster biosynthesis and, hence, many other Fe-S proteins possibly related to the chilling stress response or to plant recovery including the synthesis of antioxidative-repair enzymes. The expression of the *A. thaliana* NFS1 gene was shown to be required for the activity of aldehyde oxidase (AO) enzymes that depend on two [2Fe-2S] clusters, FAD and MoCo. A

link between *AtNFS1* and phytohormone biosynthesis was shown through the strongly diminished activities of AOs in antisense *NFS1* lines of *Arabidopsis* (Frazzon *et al.*, 2007).

Clearly, the primary metabolisms of carbon, nitrogen and sulfur have to be modulated to establish a new homeostasis under chilling stress, as reviewed by Thomashow (2001). Many enzymes related to such primary metabolisms were shown to be induced by abiotic stresses like chilling. For instance, cysteine synthase 1 is the enzyme responsible for the final step in cysteine biosynthesis, which is a key limiting step in the production of glutathione, a thiol implicated in resistance to biotic and abiotic stresses (May, 1998). S-adenosylmethionine synthetase 2 catalyzes the biosynthesis of S-adenosyl-L-methionine (SAM), a precursor of ethylene and polyamines (Yan, 2005). It has also been reported that there is a close correlation between chilling tolerance and polyamine accumulation level in rice under chilling stress. The energy metabolism in plant cells is also altered under chilling stress, as reviewed by Lee *et al.* (1995) and Thomashow (2001). The ATP synthase α and β chains are for instance degraded in rice under chilling stress, which unavoidably resulted in decreased ATP production through photophosphorylation and thus affecting the Calvin cycle in photosynthesis (Yan *et al.*, 2005). The phenotypes (thinner stems and an overall smaller size, a slow growth rate, very early onset of bolting, and an altered rosette pattern relative to wild type or an accelerated growth rate, disrupted rosette formation, and altered leaf shape relative to wild type) of *Arabidopsis* plants in which some mitochondrial genes involved in the biosynthesis of Fe-S proteins were down-regulated indicated that *AtNFS1* and two *AtIscU* proteins contributed to the maturation of Fe-S proteins essential for normal plant growth and development (Frazzon *et al.*, 2007).

In addition to a sulfur donor and scaffold proteins, the *isc* gene cluster encodes a ferredoxin and two chaperones, the Hsp70-like HscA and its co-chaperone HscB. HscA and HscB proteins are likely to serve as molecular chaperones that specifically assist in the maturation of Fe/S proteins and these genes were shown to be crucial for [Fe-S] cluster biosynthesis in *Escherichia coli* (Tapley and Vickery, 2004). The expression of *EgrISA1* and *EgrNFS1* could be modulated by ABA signaling indicating that the expression of these genes are essential for building up [Fe-S] clusters that are part of chaperone-like proteins in *E. grandis*. It seems consistent that the induction of both gene expressions after ABA treatment would help to prevent plants from a possible damage due to water deficiency through a chaperone-like repair mechanism. Nevertheless, it is still necessary to

unequivocally prove that such chaperone-like repair mechanism is limited or strictly dependent on the expression of [Fe-S] cluster-assembling proteins like ISA1 or NFS1.

One possible explanation for such higher expression of *EgrNFS1* in leaves is its possible importance in yielding sulfur for both, the photosynthesis apparatus and plant defence, since leaves are much more exposed to stresses than the internal, vascular tissues of the trunk. Many plant anti-pathogen compounds are sulfur containing and known to accumulate in higher concentrations in leaves, including thionins (Thomma *et al.*, 2002), alliins (Jones *et al.*, 2004) and glucosinolates (Griffiths *et al.*, 1998). The biosynthetic pathway for elemental sulfur production could therefore involve *EgrNFS1*. Thus this family of proteins (NifS/NFS/IscS/SufS) appears to play a broader role in the mobilization of sulfur (and selenium) within cells (Frazzon *et al.*, 2007).

The higher expression of *SufA* was expected, due to higher activity of chloroplasts in leaf tissues, expression of *SufA* was higher in leaves than in xylem. Accumulated evidence indicates that genomic homology and locus ordering between *E. grandis* and *E. globulus* is very high (Marques *et al.*, 2002). Nevertheless, regulatory regions could be responsible for the differential patterns of gene expression which would result in phenotypic variation (Grattapaglia, 2004). Transcript levels measured by our microarrays could account for genetic sources of variation associated with dominance and epistasis as well as for nongenetic sources of variation, such as developmental and environmental variation (Kirst *et al.*, 2005). Differences were observed in the relative expression profiles of all four genes encoding [Fe-S] cluster assembly proteins when comparing the xylems from two *Eucalyptus* species, suggesting that these genes may be involved in the contrasting phenotypic characteristics of the woods (differentiating xylems) from *E. globulus* and *E. grandis*.

Acknowledgments

We would like to thank Sertef Ltd. and Aracruz Celulose e Papel S.A. for the donation of *E. grandis* seeds. This work was supported by the Brazilian Ministry of Science and Technology (MCT) and National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq). J.F. (CNPq, 301131/2007-6) and R.M (CNPq, 302684/2005-0) are research

awardees from CNPq and L.A.O. is a Master Degree fellow from CNPq. Finally, we are most grateful to all researchers from private and public institutions that are part of the Genolyptus Project.

Material and methods

cDNA Library construction and sequencing

Seeds of *E. grandis* (supplied by Aracruz Cellulose S.A., Guaíba, RS, Brazil) were surface sterilized by sequentially soaking in 70% ethanol for 2 min, 1% (v/v) active chlorine solution for 15 min and five times in sterilized water. Seeds were then placed in culture flasks (5 cm in diameter, 8 cm high) containing the Murashige & Skoog (MS, Invitrogen) complete medium solidified by 0.7% (w/v) Phytoagar (Duchefa) and left to germinate in the dark for two days at 26 \pm 2 °C. After germination, flasks were transferred to a culture room with a 16 h photoperiod at the same temperature. Total RNA was extracted from 60-days old *E. grandis* seedlings using Concert Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions for multi RNA minipreps. Messenger RNA was extracted by the employment of the Oligotex mRNA Purification System (Qiagen). A total amount of 5 μ g mRNA was finally used for cDNA library construction by the Superscript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning Kit (Invitrogen).

Plasmid DNA preparation was carried out in 96-well microplates using standard methods based on alkaline lysis and filtration in Millipore filter plates. Plasmid samples were sequenced using the automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armed with 50 cm capillaries and POP6 polymer (Applied Biosystems). DNA templates (30 to 45 ng) were labeled with 3.2 pmol of primer GlyptsRev1 (5'-ATAGGGAAAGCTGGTACGC-3') or M13 -40 forward (5'-GTTTCCCAGTCACGACGTTGTA-3', Amersham Biosciences) and 2 μ L of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) in a final volume of 10 μ L. Labeling reactions were performed in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) thermocycler with a initial denaturing step of 96 °C for 3 min followed by 25 cycles of 96 °C for 10 sec, 55 °C for 5 sec and 60 °C for 4 min. Labeled samples were

purified by isopropanol precipitation followed by 70% ethanol rinsing. Precipitated products were suspended in 10 μ L formamide, denatured at 95 °C for 5 min, ice-cooled for 5 min and electroinjected in the automatic sequencer. Sequencing data were collected using the software Data Collection v1.0.1 (Applied Biosystems). Data generated were processed by a suite of programs available at the Universidade Católica de Brasília (<http://www.ucb.br/genolyptus>) prior to assembly with the PHRED (Ewing, 1998a; Ewing, 1998b) and PHRAP (<http://phrap.org/>) algorithms. Accepted ESTs were selected based on a minimal length of 250 bp with every base having a quality of PHRED higher than 20.

Plant material and treatments

Three to four *E. grandis* surface-sterilized seeds were grown *in vitro* for 4 months at 25 °C under a photoperiod of 16 h. Later, samples were subjected to different treatments with three sprays (300 μ l each) in flasks composed as follows: 0.2 mg/L kinetin (kin); 2 mg/L 1-naphthaleneacetic acid (NAA); 0.5 mM abscisic acid (ABA) and 0.5 M sodium chloride (NaCl). Drought treatment consisted in leaving the flasks opened overnight in the culture room followed by water spray and kept overnight at the culture room. Chilling treatment consisted in leaving flasks during 3 days at 4 °C followed also by water spray and overnight incubation at the culture room. Control plants were not sprayed at all or treated similarly with three sprays of pure water and left along the other flasks in the culture room until harvesting. After the simultaneous overnight incubations, all seedlings were harvested and immediately frozen and stored in liquid nitrogen. All the analyses were performed in biological duplicates.

Bioinformatics analysis

Clustered DNA sequences of the Genolyptus Project Database, derived from expressed sequence tags (ESTs) obtained from cDNAs generated from different tissues, organs or growth conditions, were the primary data source for this work. A putative *ISAI*, *ISUI* and *NFSI* cDNA were identified and BLASTx and BLASTn programs available at The National Center for Biotechnology Information (NCBI) homepage were used to confirm the identity of the ESTs. Proteins from other species were extracted from the NCBI RefSeq

database. The species and their respective access numbers are as follows (*NFS1*, *ISU1* and *ISA1* respectively): *Oryza sativa japonica* (NP_001062914/ NP_001043783/ BAD44876), *Populus trichocarpa* (estExt_Genewise1_v1.C_LG_VII0255/ eugene3.00150565/ estExt_Genewise1_v1.C_LG_X3413), *Vitis vinifera* (CAO22685/ CAO66090/ CAO15918), *Arabidopsis thaliana* (At5g65720/ At4g22220/ At2g16710), *Mus musculus* (CAA10916/ NP_079802/ NP_081197), *Gallus gallus* (NP_001026018 XP_417318/-/-), *Ostreococcus tauri* (CAL52881/-/ CAL55019), *Physcomitrella patens* (XP_001773635/ XP_001785718/-/-), *Pongo pygmaeus* (Q5RDE7/-/-), *Homo sapiens* (NP_066923/ Q9H1K1/ AAG59854), *Escherichia coli* (ACB18360/ NP_289086/ YP_541841), *Azotobacter vinelandii* (AAC24472/ ZP_00418131/ ZP_00418130), *Canis lupus familiaris* (-/XP_534722/-/-), *Picea sitchensis* (-/ABK21226/-/-), *Equus caballus* (XP_001501842/-/-) and *Chlamydomonas reinhardtii* (-/XP_001697636). Protein sequence alignments were carried out using ClustalW with default parameters and edited using the GeneDoc Program. Phylogenetic analysis was performed with the Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) Package Version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) with the Neighbour-Joining method. All gap and missing data in the alignments were analyzed using a pairwise deletion. The molecular distances of the aligned sequence were calculated with MEGA 4.0 according to the *p*-distance parameter and complete deletion. The bootstrap test was performed with 1000 replications. The parsimony analysis were implemented in the PAUP* 4.0 software package (Swofford, 1993). Maximum-parsimony trees were obtained by 100 random addition heuristic search replicates and the tree bisection-reconnection (TBR) branch-swapping option.

Microarray Analysis

In order to have an evaluation of gene expression patterns in leaf and vascular tissues of two different *Eucalyptus* species, *E. grandis* and *E. globulus*, microarray analysis including all unique EST sequences was carried out. Twenty microgram of each RNA sample were dried down and sent to NimbleGen Systems Inc. Nine 50-mer probes were designed and synthesized in duplicates from the 21.442 ESTs of the Genolyptus Project at NimbleGen. Synthesis of Cy3-labeled cDNAs, hybridizations, washings, scanning and preliminary analyses were carried out by NimbleGen, following a standard expression

design. Normalized gene expression values for each feature were yielded taken into account the hybridization values for all 9 probes per gene, in duplicates. The final analyses were performed using MultiExperiment Viewer (MEV), developed at The Institute for Genomic Research (TIGR). Data normalization was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. ANOVA, Duncan analysis and *t-test* were performed using SSPS15. Relative expression of the genes in leaves and xylem was calibrated with *EgrNFS1* xylem fluorescence values, and relative expression between xylems was calibrated with *E. grandis* fluorescence values.

Quantitative reverse transcription-PCR

Total RNA was extracted with Pure Link Plant RNA Purification (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions for multi RNA minipreps. About one μg of total RNA was added to each cDNA synthesis using M-MLV reverse transcriptase (Promega). PCR amplification was carried out using specific primer pairs designed with the employment of the GenScript Corporation's Real-Time PCR Primer Design tool.

Quantitative reverse transcription-PCR (*qRT-PCR*) was carried out in an Applied Biosystem 7500 Real-time Cycler. Histone H2B and ribonucleoprotein L23A gene sequences were used as internal controls to normalize the amount of mRNA present in each sample, using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method described by Livak and Schmittgen (2001). Three internal replications per experiment were performed. ANOVA and Duncan analysis were performed using SSPS15.

References

Agar, J.; Krebs, C.; Frazzon, K.; Huynh, B.; Dean, D. and Johnson, M. (2000) IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry*, v.39, p. 7856 -7862.

Amme, S.; Matros, A.; Schlesier, B. and Peter Mock, H. (2006). Proteome analysis of cold stress response in *Arabidopsis thaliana* using DIGE-technology. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, n. 7, p. 1537–1546.

Balk, J. and Lill, R. (2004) The cell's cookbook for iron-sulfur clusters: recipes for fool's gold. *Chembiochem*, v. 5, p. 1044-1049.

Balk, J. and Lobréaux, S. (2005) Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends in Plants Science*, v. 10, n. 7, p. 324-331.

Ball, M.; Canny, M.; Huang, C. and Heady, R. (2004) Structural changes in acclimated and unacclimated leaves during freezing and thawing. *Functional Plant Biology*, v. 31, p. 29-40.

Biswal, B.; Raval, M.; Biswal, U. and Joshi, P. (2008) Response of Photosynthetic Organelles to Abiotic Stress: Modulation by Sulfur Metabolism, in Khan, N.; Singh, S.; Umar, S. (eds.). *Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants*, Berlin/Heidelberg: Springer, p. 167-191.

Brodribb, T. and Hill, R. (2000) Increases in Water Potential Gradient Reduce Xylem Conductivity in Whole Plants. Evidence from a Low-Pressure Conductivity Method. *Plant Physiology*, v. 123, p. 1021-1028.

Cavender-Bares, J. (2007) Chilling and freezing stress in live oaks (*Quercus* section *Virentes*): intra- and inter-specific variation in PS II sensitivity corresponds to latitude of origin. *Photosynthesis Research*, v. 94, n. 2/3, p. 437-453.

Dutkiewicz, R.; Schilke, B.; Knieszner, H.; Walter, W.; Craig, E. and Marszalek, J. (2003) Ssq1, a Mitochondrial Hsp70 Involved in Iron-Sulfur (Fe/S) Center Biogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 32, p. 29719-29727.

Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M. and Green, P. (1998a) Base-calling of automated sequencer traces using phred, I: Accuracy assessment. *Genome Research*, v. 8, p. 175-185.

Ewing, B. and Green, P. (1998b) Base-calling of automated sequencer traces using phred, II: Error probabilities. *Genome Research*, v. 8, p. 186-194.

Frazzon, A.; Ramirez, M.; Warek, U.; Balk, J.; Frazzon, J.; Dean, D. and Winkel, B. (2007) Functional analysis of *Arabidopsis* genes involved in mitochondrial iron-sulfur cluster assembly. *Plant Molecular Biology*, v. 64, n. 3, p. 225-240.

Grattapaglia, D. (2004) Integrating genomics into *Eucalyptus* breeding. *Genetics and Molecular Research*, v. 3, p. 369-379.

Griffiths, D.; Birch, A. and Hillman, J. (1998) Antinutritional compounds in the *Brassicaceae*: analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, v. 73, n. 1, p. 1-18.

Hawkesford, M. and Kok, L. (2006) Managing sulphur metabolism in plants. *Plant, Cell and Environment*, v. 29, p. 382-395.

Hays, D. and Skinner, D. (2001) Development of an expressed sequence tag (EST) library for *Medicago sativa*. *Plant Science*, v. 161, n. 3, p. 517-526.

Johnson, D.; Dean, D.; Smith, A. and Johnson, M. (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry*, v. 74, p. 247-281.

Jones, M.; Hughes, J.; Tregova, A.; Milne, J.; Tomsett, A. and Collin, H. (2004) Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, p. 1903–1918.

Kayal, W.; Navarro, M.; Marque, G.; Keller, G.; Marque, C.; Teulieres, C. (2006) Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from *Eucalyptus* in response to cold. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, n. 10, p. 2455–2469.

Kessler, D. and Papenbrock, J. (2005) Iron–sulfur cluster biosynthesis in photosynthetic organisms. *Photosynthesis Research*, v.86, p. 391–407.

Khush, G. (1999) Green revolution: preparing for the 21st century. *Genome*, v. 42, p. 646-655.

Kirst, M.; Basten, C.; Myburg, A.; Zeng, Z. and Sederoff, R. (2005) Genetic architecture of transcript-level variation in differentiating xylem of a *Eucalyptus* hybrid. *Genetics*, v. 169, p. 2295-2303.

Krebs, C.; Agar, J.; Smith, A.; Frazzon, J.; Dean, D.; Huynh, B. and Johnson, M. (2001) IscA, an Alternate Scaffold for Fe-S Cluster Biosynthesis. *Biochemistry*, v. 40, 14069-14080.

Krishna, P.; Sacco, M.; Cherutti, J. and Hill, S. (1995) Cold-induced accumulation of hsp90 transcripts in *Brassica napus*. *Plant Physiology*. v. 107, p. 915–923.

Kuk, Y.; Shin, J.; Burgos, N.; Hwang, T.; Han, O.; Cho, B.; Jung, S. and Guh, J. (2003) Antioxidative Enzymes Offer Protection from Chilling Damage in Rice Plants. *Crop Science*, v. 43, p. 2109–2117.

Kushnir, S.; Babiychuk, E.; Storozhenko, S.; Davey, M.; Papenbrock, *et al.* (2001) A mutation of the mitochondrial ABC transporter *Stal* leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant *starik*. *The Plant Cell*, v. 13, p. 89–100.

Lee, T.; Lur, H. and Chu, C. (1995) Abscisic-acid and putrescine accumulation in chilling-tolerant rice cultivars. *Crop Science*, v. 35, p. 502-508.

Lill, R. and Kispal, G.. (2000) Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends in Biochemical Science*, v. 25, p. 352–356.

Lill, R. and Mühlenhoff, U. (2005). Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 30, n. 3, p. 133-141.

Lill, R. and Mühlenhoff, U. (2006) Iron-Sulfur Protein Biogenesis in Eukaryotes: Components and Mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 22, p. 457-486.

Lill, R. and Mühlenhoff, U. (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes and diseases. *The Annual Review of Biochemistry*, 77: 22.1–22.32.

Livak, K. and Schmittgen, T. (2001) Analysis of Relative Gene Expression data using Real-time quantitative PCR and the Method $2^{-\Delta\Delta CT}$. *Methods*, v. 25, p. 402-408.

Loiseau, L.; Ollagnier-de-Choudens, S.; Nachin, L.; Fontecave, M. and Barras, F. (2003) Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial Suf system: SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 38352–38359.

Mahajan, S. and Tuteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 444, p. 139–158.

Marques, C.; Brondani, R.; Grattapaglia, D. and Sederoff, R. (2002) Conservation of microsatellite loci and QTL for vegetative propagation in *Eucalyptus tereticornis*, *E. globulus*, *E. grandis* and *E. urophylla*. *Theoretical and Applied Genetics*, v.105, p. 474–478.

May, M.; Vernoux, T.; Leaver, C.; Van Montagu, M. and Inze, D. (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany*, v. 49, p. 649-667.

MEV: MultiExperiment Viewer, version 4.0, 276p (<http://mev.tm4.org>), 2006.

Classen-Linke, I.; Vloet, A.; Beier, H. and Krusche, C. (2005) Estradiol and medroxyprogesterone acetate regulated genes in T47D breast cancer cells. *Molecular and cellular endocrinology*, v. 235, p.39-50.

- Mühlenhoff, U. and Lill, R. (2000) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1459, p. 370-382.
- Nambara, E. and Marion-Poll, A. (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, v. 56, p. 165-185.
- Qureshi, M.; Qadir, S. and Zolla, L. (2007) Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *Journal of Plant Physiology*. v. 164, p. 1239-1260.
- Rausch, T. and Wachter, A. (2005) Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends in Plant Science*, v. 10, n. 10, p. 503-509.
- Sterky, F.; Bhalerao, R.; Unneberg, P.; Segerman, B.; Nilsson, P.; *et al.* (2004) A Populus EST Resource for Plant Functional Genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 38, p. 13951-13956.
- Swofford, D. (1993) PAUP - a Computer-Program for Phylogenetic Inference Using Maximum Parsimony. *The Journal of General Physiology*, 102, A9-A9.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2004) *Fisiologia Vegetal*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0.
- Tapley, T. and Vickery, L. (2004) Preferential substrate binding orientation by the molecular chaperone HscA. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 27, p. 28435–28442.
- Thomashow, M. (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 50, p. 571–599.
- Thomashow, M. (2001) So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiology*, v. 125, p. 89–93.
- Thomma, B.; Cammue, B. and Thevissen, K. (2002) Plant defensins. *Planta*, v. 216, p. 193–202.
- Unciuleac, M.; Chandramouli, K.; Naik, C.; Mayer, S.; Huynh, B.; Johnson, M. and Dean, D. (2007) In vitro activation of apo-aconitase using a [4Fe-4S] cluster-loaded form of the IscU [Fe-S] cluster scaffolding protein. *Biochemistry*, v. 46, p.6812-6821.

Ünyayar, S. and Çekiç, F. (2005) Changes in Antioxidative Enzymes of Young and Mature Leaves of Tomato Seedlings under Drought Stress. *Turkish Journal of Biology*, v. 29, p. 211-216.

Williams, J. and Cooper, R. (2004) The oldest fungicide and newest phytoalexin – a reappraisal of the fungitoxicity of elemental sulphur. *Plant Pathology*, v. 53, p. 263–279.

Yan, S.; Tang, Z.; Su, W. and Sun, W. (2005) Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics*, v. 5, p. 235-244.

Yang, J.; Bitoun, J. and Ding, H. (2006) Interplay of IscA and IscU in Biogenesis of Iron-Sulfur Clusters. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 38, p. 27956–27963.

Zheng, L.; White, R.; Cash, V.; Jack, R. and Dean, D. (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.90, p. 2754-2758.

Zheng, L and Dean, D. (1994) Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulfur cluster. *The Journal of Biological Chemistry*, v.269. p. 18723-18726.

Zheng, L.; Cash, V.; Flint, D. and Dean, D. (1998) Assembly of Iron-Sulfur Clusters. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 13264-13272.

Zhu, J. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 53, p. 247-273.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: Phylogenetic trees constructed for evaluating the relation among [Fe-S] cluster proteins. Trees were constructed using the ClustalW alignment tool of the deduced amino acid sequences of different organisms. (A) NFS1, (B) ISA1 and (C) ISU1.

Figure 2: *In silico* analysis of microarray results comparing the relative gene expression profiles of *E. grandis* leaves and xylem. Expression observed for each [Fe-S] encoding genes was calibrated with *NFS1* xylem fluorescence value.

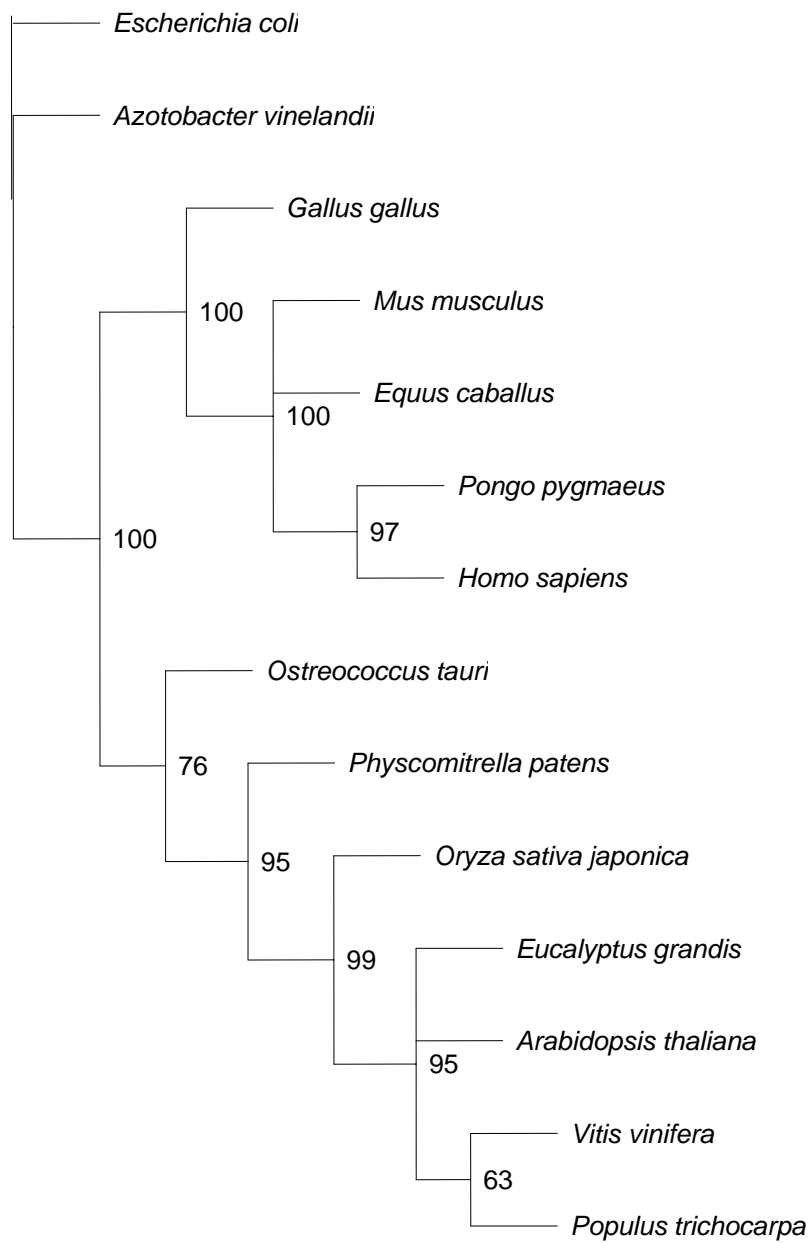
Figure 3: *In silico* analysis of microarray results comparing the relative gene expression profiles in xylem of *E. grandis* and *E. globulus*. Expression observed for each [Fe-S] encoding genes was calibrated with *E. grandis* fluorescence values.

Figure 4: Quantitative RT-PCR analysis of *ISAI*, *ISUI* and *NFS1* gene expressions from total RNA isolated from *E. grandis* treated seedlings. Results are expressed as the relative quantification of amplification products using two independent internal controls, histone H2B (His) and ribonucleoprotein L23A (Rib). Treatments of seedlings included abscisic acid (ABA); 1-naphthaleneacetic acid (NAA); kinetin (Kin); sodium chloride (salt); chilling and drought. Control plants were treated with water and immediately frozen in liquid nitrogen prior to total RNA extraction. (A) *EgrISUI*, (B) *EgrISAI* and (C) *EgrNFS1*.

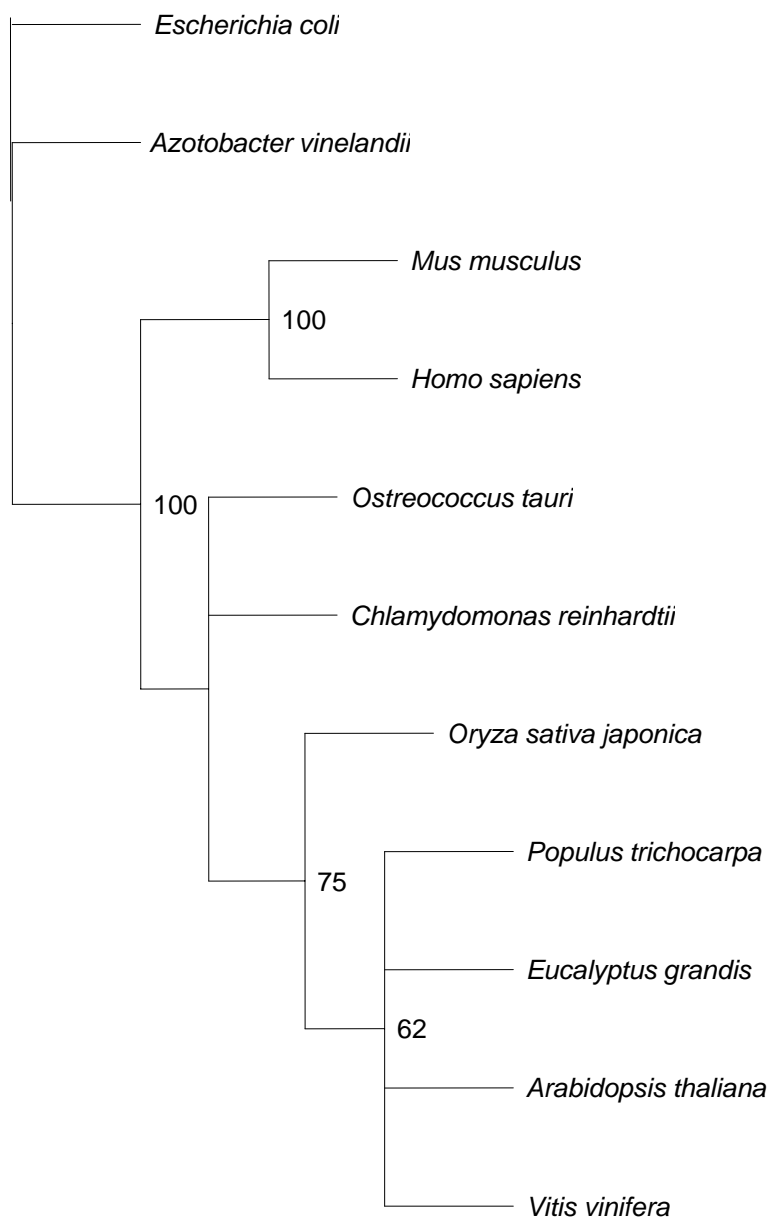
FIGURES

Figure 1

(A) NFS1



(B) ISA1



(C) ISU1

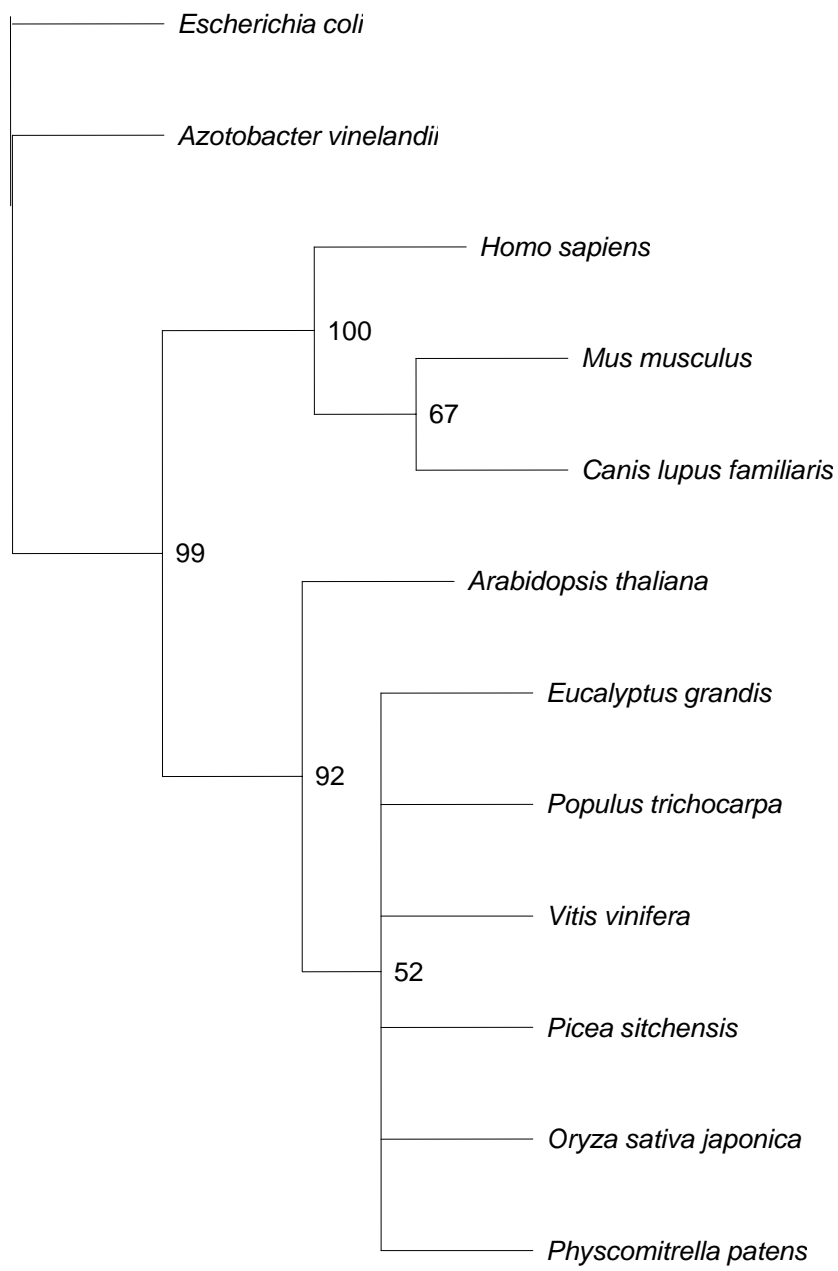


Figure 2

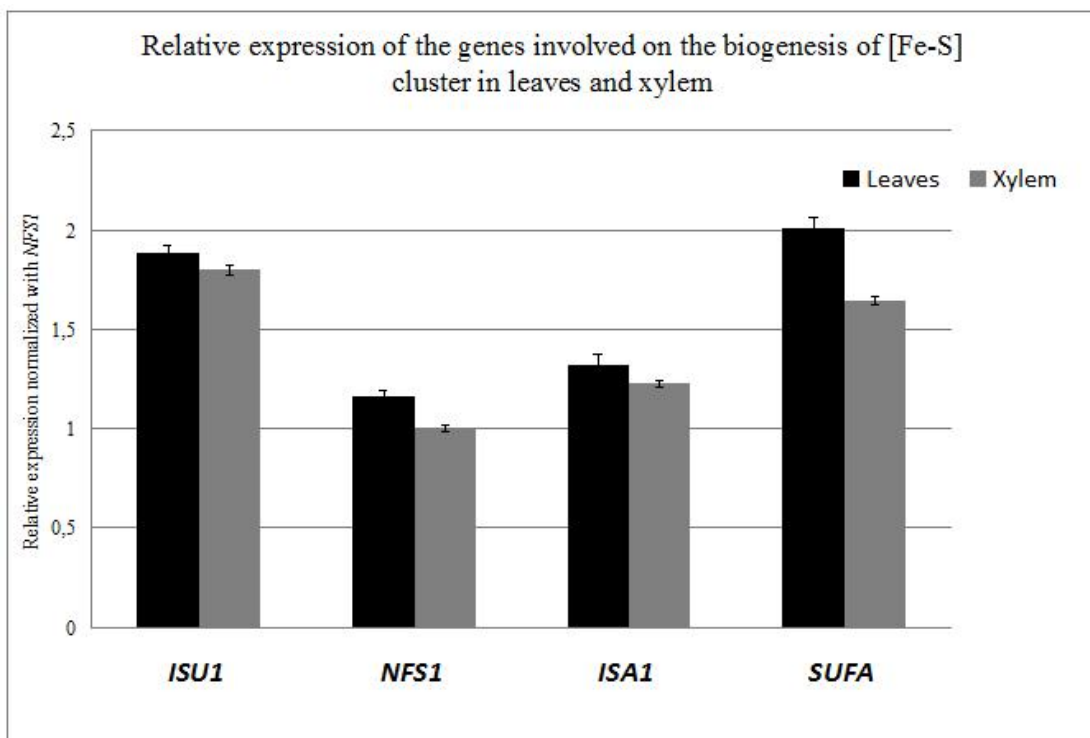


Figure 3

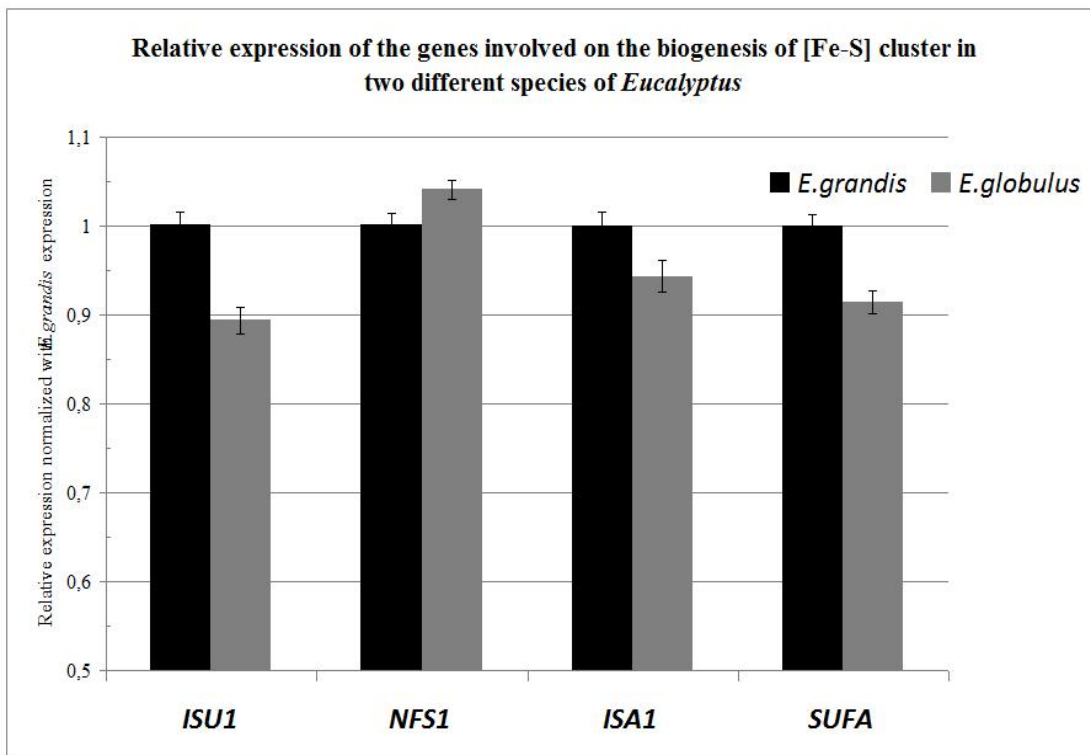
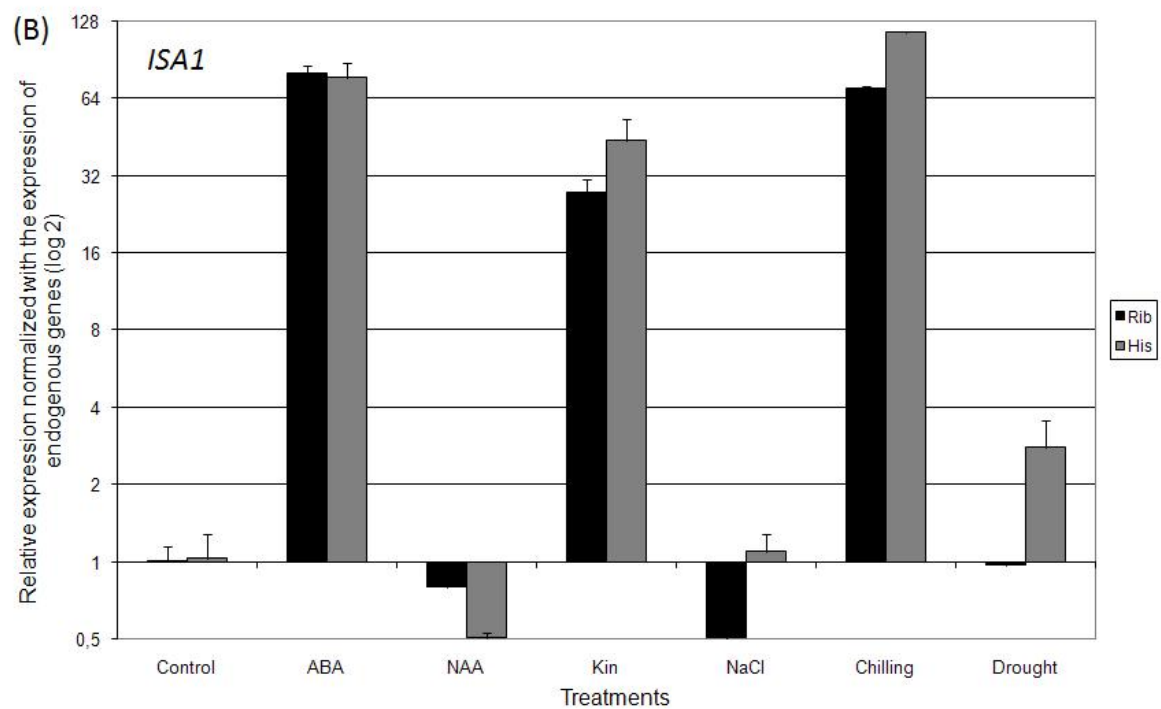
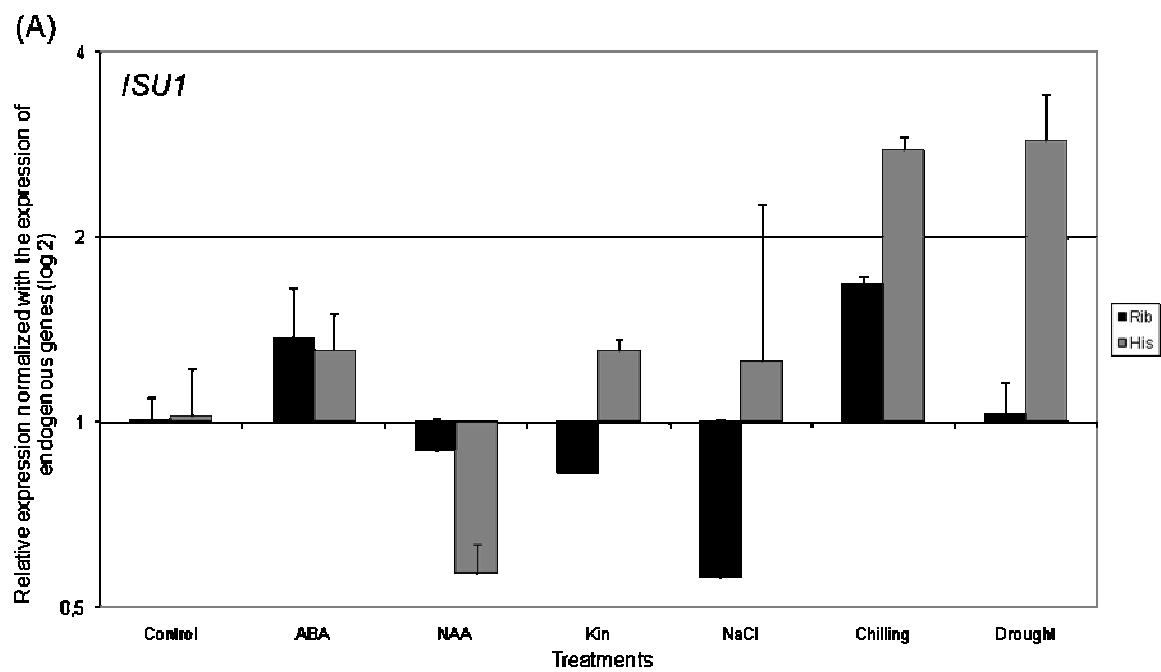
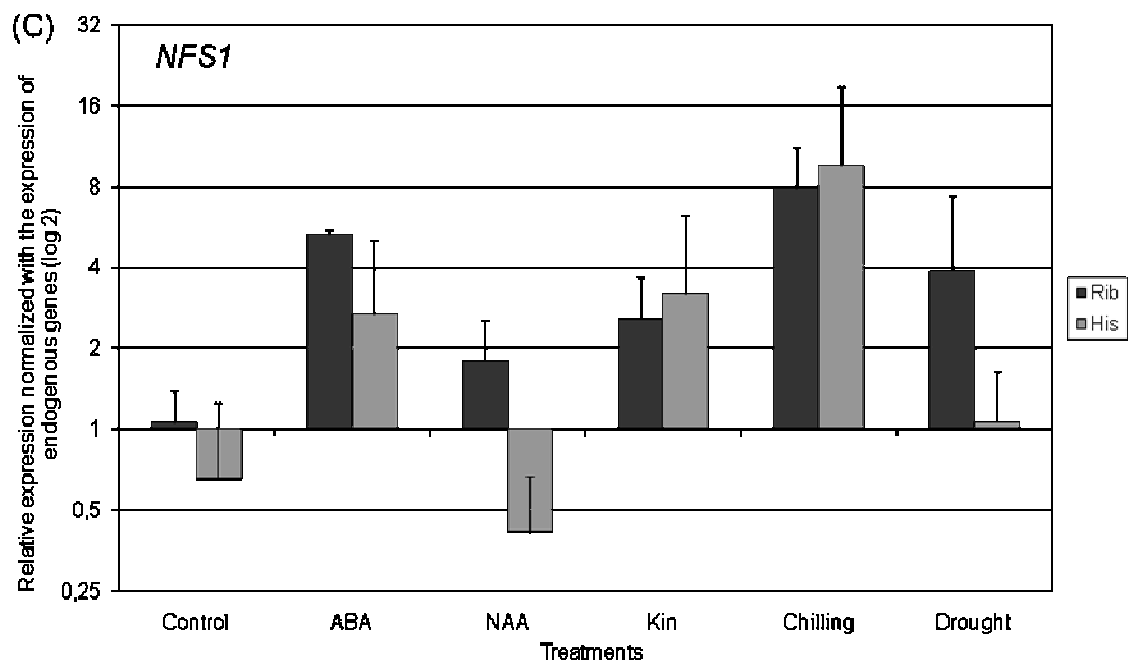


Figure 4





Capítulo III

Avaliação da expressão de genes codificadores de proteínas de montagem de agrupamentos [Fe-S] em resposta ao Resfriamento: Experimento de “*Time-course*”

3.1 Materiais e métodos

3.1.1 Material Vegetal

3.1.1.1 Germinação de sementes

Sementes de *E. grandis* (fornecidas pela empresa Aracruz Celulose S.A, Guaíba, RS, Brasil) foram esterilizadas superficialmente utilizando-se sequencialmente etanol 70% por 2 minutos, hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos e 5 lavagens com água destilada estéril. As sementes foram colocadas em frascos de cultura (5 cm de diâmetro, 8 cm de altura) contendo o meio de cultura Murashige & Skoog (MS, Invitrogen) solidificado com 0,7% de fitoágar (Duchefa). Os frascos foram mantidos por 72 horas no escuro a 25°C para germinação. Após a germinação, os frascos foram submetidos a fotoperíodo de 16 horas na mesma temperatura.

3.1.1.2 Cinética de incubação

Após três meses da germinação das sementes, as plântulas mantidas *in vitro* foram submetidas ao regime de uma semana sob luz contínua, sendo posteriormente submetidas à temperatura de 4°C durante 0, 1, 2, 4, 8 e 16 horas na mesma incubadora e sob luz contínua. Cada frasco continha 4 plântulas que foram colhidas e imediatamente estocadas em nitrogênio líquido (Anexo A). O experimento foi realizado com triplicatas biológicas.

3.1.1.3 Extração de RNA

O RNA total das plântulas de *E. grandis* (parte aérea e raízes), crescidas *in vitro* e tratadas, foi isolado utilizando-se o kit PureLink Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen) de acordo com o protocolo do produto “Small Scale RNA Isolation”,

fornecido pelo fabricante. A qualidade e quantificação das amostras foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1,2%, tampão TAE 1X (Tris 4mM, ácido bórico 2mM e EDTA 0,1mM) e por espectrofotometria (leitura de absorbâncias a 260nm e a 280nm).

A partir do RNA total, foi isolado o RNA mensageiro, utilizando-se o kit Oligotex mRNA Purification System (Quiagen), conforme o protocolo Oligotex mRNA Spin-Column que acompanha o kit.

3.1.1.4 Síntese de cDNA

A reação de síntese dos cDNAs foi realizada com 300 ng de mRNAs utilizando oligo-dT_{30(v)} (SMART CDS II A, RW Genes – Clontech). Utilizou-se por reação 1 µl da enzima M-MLV Reverse transcriptase da Invitrogen (200U/µl), o respectivo tampão de reação (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,01 % v/v NP-40; 50% glicerol v/v), 5mM de desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTPs), 10 pmol de oligo-dT. A síntese foi realizada com uma temperatura inicial de 65°C durante 5 minutos e após as amostras permaneceram no gelo por 2 minutos, 37°C por 50 minutos e a inativação da reação se deu por 15 minutos a 70°C. Para cada amostra uma única reação de síntese de cDNA foi executada.

3.1.1.5 RT-PCR quantitativa em tempo real

Os cDNAs das amostras foram diluídos 10 vezes em água MilliQ autoclavada. Em todos os experimentos de qRT-PCR foram utilizadas as mesmas alíquotas, triplicatas biológicas e realizadas quadruplicatas experimentais. As reações foram efetuadas no equipamento ABI Prism 7500 Detection System (Applied Biosystems) utilizando-se os seguintes parâmetros de amplificação: 5 minutos a 94°C, 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 60°C por 10 segundos, 72°C por 15 segundos e 60°C por 35 segundos. As reações foram realizadas em um volume final de 20 µl contendo 0,2µM dos *primers* gene-específicos, 0,1 mM de dNTPs, 1,5 µM de MgCl₂, 0,25 U da enzima DNA polimerase Platinum Taq (5 U/µl, Invitrogen), tampão da enzima 10X, SYBR green 10X e 10 µl dos cDNAs 1:10. A especificidade das amplificações e o ponto de corte C_T (*threshold cycles*) foram determinados utilizando-se o programa 7500 System SDS Software (Applied

Biosystems). Para normalizar a expressão dos genes de interesse, foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por Livak e Schmittgen (2001). A expressão relativa dos genes de interesse foi calculada a partir das eficiências das reações e do desvio do C_T das amostras-alvo *versus* as amostras-controle. Para a normalização dos dados foi utilizado como gene constitutivo a Ribonucleoproteína L23A. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o teste de Duncan no programa SPSS 15 e ao nível de 5% de significância.

3.2 Resultados e Discussão

Com base nos resultados observados nos experimentos de qRT-PCR anteriores, onde a expressão relativa dos genes associados à biossíntese de agrupamentos [Fe-S] encontrava-se aumentada após o tratamento de resfriamento, um novo conjunto de experimentos foi conduzido com o objetivo de avaliar em maior detalhe o momento desta indução. Previamente (uma semana) e durante todo o tratamento a 4°C, as plantas foram mantidas sob luz contínua de forma a evitar possíveis interferências associadas às modificações metabólicas típicas do ciclo circadiano vegetal.

De acordo com os resultados obtidos nas análises de qRT-PCRs realizadas com os cDNAs das plântulas de 90 dias submetidas a 0, 1, 2, 4, 8 e 16 horas de tratamento a 4°C, o gene *EgrISU1* apresentou maior expressão nas primeiras duas horas de tratamento, retornando a valores próximos ao basal após 4 horas (Figura 1A). O gene *EgrISAI*, que havia apresentado a maior expressão relativa no experimento anterior, não apresentou diferença significativa no padrão de expressão durante os tempos 1, 2 e 4 horas, porém a expressão nestes tempos difere estatisticamente da expressão nos tempo 0, 8 e 16 horas (Figura 1B). O gene *EgrNFS1* não apresentou diferença de expressão durante as 16 horas de resfriamento (Figura 1C). Esses resultados indicam que as proteínas Fe-S podem não estar envolvidas na direta resposta ao estresse por frio e, sim, na recuperação das plantas após o estresse. No experimento anterior, após 72 horas de exposição a 4°C, as plântulas foram coletadas após adicionais 24 horas sob temperatura ambiente (25°C), o que pode caracterizar um período de recuperação das mesmas a um metabolismo mais ativo e normal. Por outro lado, segundo Sonoike (1998), os danos promovidos pelo resfriamento aos tecidos vegetais aumentam ainda mais quando os mesmos são transferidos para temperaturas superiores àquela de resfriamento. Provavelmente a maior expressão relativa

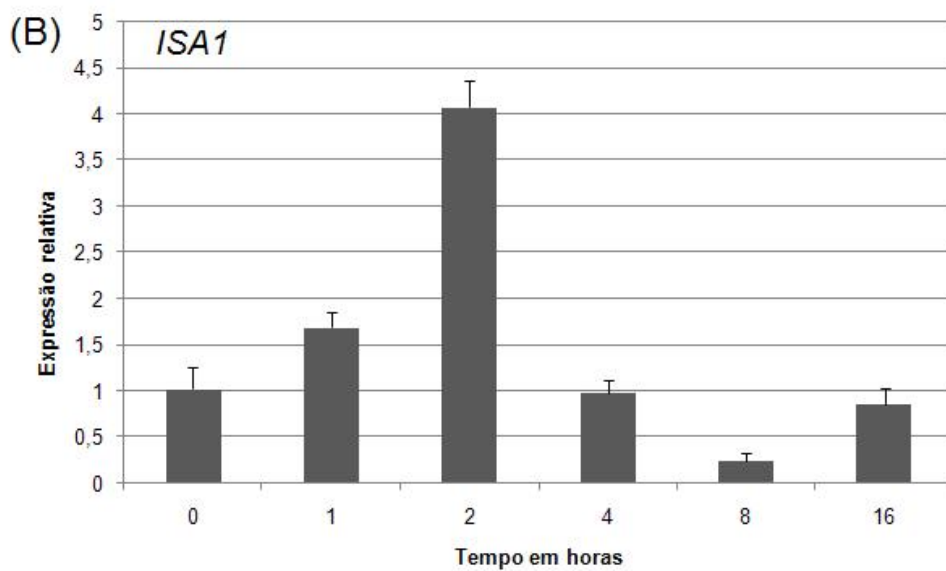
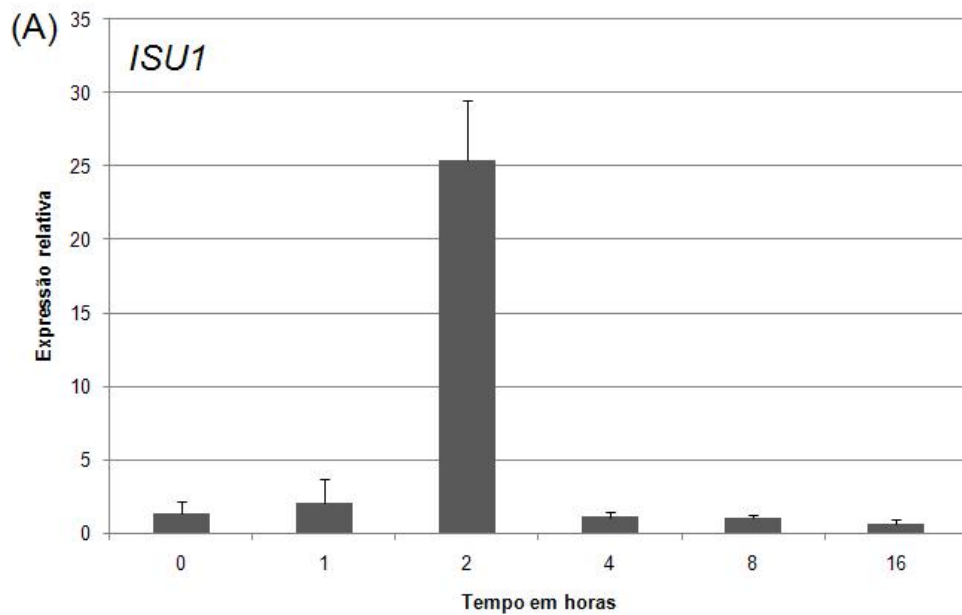
dos genes esteja relacionada com a maior necessidade de enzimas de reparo celular, segundo esta linha de evidências. Neste sentido, já foram descritas enzimas de reparo que utilizam como co-fatores os agrupamentos [Fe-S] (Rebeil & Nicholson, 2001; Lill & Mühlenhoff, 2006; Kuo *et al.*, 1992; Guan *et al.*, 1998) corroborando a idéia de que esses genes estariam intensamente envolvidos no restabelecimento da homeostase.

A presença de agrupamentos [4Fe-4S] em enzimas envolvidas no reparo de DNA levou ao questionamento do papel desses co-fatores no reconhecimento e reparo do dano ao DNA (Lukianova & David, 2005). É intrigante o fato de que certas glicosilases que removem uma ampla variedade de bases danificadas do DNA, também possuem diferentes seqüências e estruturas incluindo esta classe de cofatores (David & Williams, 1998; Hinks *et al.*, 2002; Sandigursky & Franklin, 1999; Hoseki *et al.*, 2003; Pearl, 2000). Evidências bioquímicas e estruturais indicam que a região do agrupamento está intimamente envolvida na ligação ao DNA e que as interações de ligação têm impacto direto na catálise e na remoção da base. Minimamente, os agrupamentos [Fe-S] desempenham um papel estrutural único pelo reconhecimento, posicionamento e distorção da dupla hélice de DNA para a atividade de remoção de bases (Lukianova & David, 2005).

Além da função de reparo de DNA, os agrupamentos são cofatores para enzimas envolvidas na replicação celular e das fitas parentais de DNA. As proteínas eucarióticas com atividade de primase são enzimas heterodiméricas compostas por uma subunidade menor (PriS) e uma maior (PriL) e são, ambas, proteínas Fe-S. A ligação ao agrupamento [Fe-S] é mediada por um domínio evolutivamente conservado na porção C-terminal da subunidade maior. O domínio Fe-S é essencial para a capacidade da primase eucariótica iniciar a replicação do DNA (Klinge *et al.*, 2007).

Por outro lado, essas proteínas podem estar envolvidas na resposta ao frio e no experimento de cinética realizado, a duração do estresse pode ter sido insuficiente para se observar uma maior expressão dos genes, tal qual foi observado no primeiro conjunto de experimentos. Mahajan & Tuteja (2005) descreveram que diversas plantas, especialmente aquelas nativas de áreas quentes, exibem sintomas de injúria quando expostas a temperaturas de resfriamento, porém os sintomas de injúria nestas plantas aparecem entre 48 e 72 horas após o estresse. Todavia, a duração varia de planta para planta e também depende da sensibilidade da planta ao estresse por frio. Entretanto, para um melhor entendimento do papel real dos genes de biossíntese dos agrupamentos [Fe-S] na resposta

ao frio, um número maior de experimentos deverá ser realizado, incluindo plântulas submetidas ao frio e com posterior recuperação (*time-course* durante a fase de recuperação) e maior tempo de exposição à baixa temperatura.



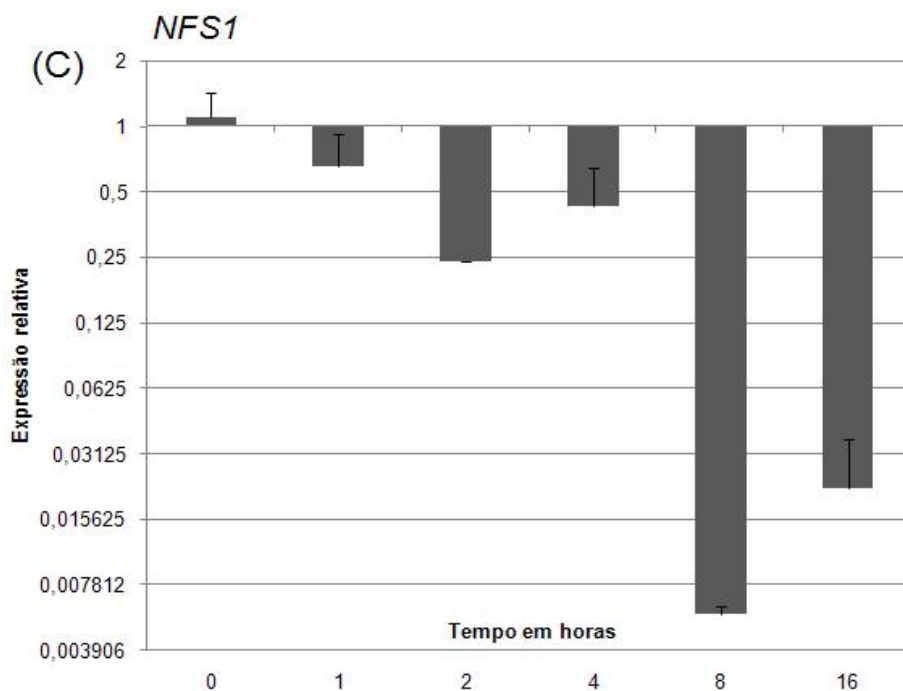


Figura 1: Análise por RT-PCR quantitativa em tempo real da expressão relativa dos genes *ISUI(A)*, *ISUI(B)* e *NFS1(C)* envolvidos na biossíntese dos agrupamentos [Fe-S] sob estresse por resfriamento (4°C). Para a normalização do padrão de expressão relativa dos genes foi utilizado o gene constitutivo da Ribonucleoproteína L23A (Rib). Na abscissa está representado o tempo de resfriamento em horas.

REFERÊNCIAS (Capítulos I e III)

AGAR, Jeffrey N.; KREBS, Carsten; FRAZZON, Jeverson; HUYHN, Boi Hanh; DEAN, Dennis R.; JOHNSON, Michael K. IscU as a scaffold for iron–sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe–2S] and [4Fe–4S] cluster in IscU. **Biochemistry**, v. 39, p. 7856–7862, 2000.

ALFENAS, Acelino Couto; ZAUZA, Edival A. Valverde; MAFIA, Reginaldo Gonçalves; DE ASSIS, Teotônio Francisco. **Clonagem e doenças de eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004.

ANDERSON, James V.; LI, Qin-Bao; HASKELL, Dale W.; GUY, Charles L. Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum-luninal 70-kilodalton heatshock cognate gene and expression of 70-kilodalton heat shock genes during cold acclimation. **Plant Physiology**, v. 104, p. 1359–1370, 1994.

ASHRAF, Muhammad. Breeding for salinity tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 13, p. 17-42, 1994.

BALK, Janneke; LILL, Roland. The cell's cookbook for iron–sulfur clusters: recipes for fool's gold. **Chembiochem**, v. 5, p. 1044–1049, 2004.

BALK, Janneke; LOBRÉAUX, Stéphane. Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. **Trends in Plants Science**, v. 10, n. 7, p. 324-331, 2005.

BARCISZEWSKI, Jan; MASSINO, Frank; CLARK, Brian F. C. Kinetin – A multiactive molecule. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, p. 182–192, 2007.

BASTOLLA, Fernanda Macedo. **Seleção e avaliação de genes de referência para estudos de expressão gênica em *Eucalyptus***. Porto Alegre: UFRGS, 2007, 97 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

BEINERT, Helmut; KILEY, Patricia J. Fe–S proteins in sensing and regulatory functions. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, p. 152–157, 1999.

BEINERT, Helmut; HOLM, Richard H.; MUNCK, Eckard. Iron-sulfur clusters: nature's modular multipurpose structures. **Science**, v. 277, p. 653–659, 1997.

BEINERT, Helmut. Iron–sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 5, p. 2–15, 2000.

BOSTOCK, Richard M. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 545-580, 2005.

BRAY, Elizabeth A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1035-1040, 1993.

BRUNE, Arno; ZOBEL, Bruce. Genetic base populations, gene pools and breeding populations for *Eucalyptus* in Brazil. **Silvae Genetica**, v. 30, n. 4/5, p. 146-149, 1981.

CALIEBE, Alexander; GRIMM, Rudolf; KAISER, Gesche; LUBECK, Jens; SOLL, Jürgen; HEINS, Lisa. The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein. **The Embo Journal**, v. 16, n. 24, p. 7342-7350, 1997.

CHENG, Wan-Hsing; ENDO, Akira; ZHOU, Li; PENNEY, Jessica; CHEN, Huei-Chi; ARROYO, Analilia; LEON, Patricia; NAMBARA, Eiji; ASAMI, Tadao; SEO, Mitsunori; KOSHIBA, Tomokazu; SHEEN, Jen. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. **The Plant Cell**, v. 14, p. 2723-2743, 2002.

CHINNUSAMY, Viswanathan; SCHUMAKER, Karen; ZHU, Jian-Kang. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 395, p. 225-236, 2004.

ÇİFTÇİ, Mehmet; DEMİR, Yavuz; ÖZMEN, Ismail; ATICI, Özkeş. In vivo and in vitro effects of some plant hormones on rat erythrocyte carbonic anhydrase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase activities. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 71-76, 2003.

COLODETTE, Jorge Luiz; MOKFIENSKI, Alfredo; GOMIDE, Jose Livio; OLIVEIRA, Rubens Chaves de. Relative importance of wood density and carbohydrate content on pulping yield and product quality. **Journal of Tianjin University of Science and Technology**, v. 19, n. 4, p. 71-80, 2004.

COSSINS, Andrew R. Homeoviscous adaptation of biological membranes and its functional significance, in COSSINS, Andrew R. (ed.). **Temperature Adaptation of Biological Membranes**, London: Portland Press, p. 63-76, 1994.

CUSHMAN, John C.; BOHNERT, Hans J. Genomic approaches to plant stress tolerance. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 117-124, 2000.

DAVID, Sheila S.; WILLIAMS, Scott D. Chemistry of glycosylases and endonucleases involved in base-excision repair. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1221-1261, 1998.

DIETZ, Karl-Josef; SAUTER, Angela; WICHERT, Kathrin; MESSDAGHI, David; HARTUNG, Wolfram. Extracellular β -glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 937–944, 2000.

EINSLE, Oliver; TEZCAN, F. Akif; ANDRADE, Susana L.A.; SCHMID, Benedikt; YOSHIDA, Mika; HOWARD, James B.; REES, Douglas C. Nitrogenase MoFe-Protein at 1.16 Å Resolution: A Central Ligand in the FeMo-Cofactor. **Science**, v. 297, p. 1696-1700, 2002.

ELDRIDGE, Ken; DAVIDSON, John; HARDWIID, Chris; WYK, Gerrit Van. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon, 1994.

FEDER, Martin E.; HOFMANN, Gretchen E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 243–282, 1999.

FLINT, Dennis H.; EMPTAGE, Mark H. Dihydroxy acid dehydratase from spinach contains a [2Fe-2S] cluster. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 3558-3564, 1998.

FONTECAVE, Marc; OLLAGNIER-DE-CHOUDENS, Sandrine; PY, Béatrice; BARRAS, Frédéric. Mechanisms of iron-sulfur cluster assembly: the SUF machinery. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 10, n. 7, p. 713-721, nov. 2005.

FOYER, Christine H.; NOCTOR, Graham Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 355–364, 2003.

FRAZZON, Ana Paula Guedes; RAMIREZ, Melissa V.; WAREK, Ujwala; BALK, Janneke; FRAZZON, Jeverson; DEAN, Dennis R.; WINKEL, Brenda S. J. Functional analysis of *Arabidopsis* genes involved in mitochondrial iron-sulfur cluster assembly. **Plant Molecular Biology**, v. 64, n. 3, p. 225-240, 2007.

FRAZZON, Jeverson; FICK, James R.; DEAN, Dennis R. Biosynthesis of iron-sulphur clusters is a complex and highly conserved process. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 680-685, 2002.

FRAZZON, Jeverson; DEAN, Dennis R. Formation of iron-sulfur clusters in bacteria: an emerging field in bioinorganic chemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.7, p. 166-173, 2003.

FU, Weiguang; JACK, Richard F.; MORGAN, T. Vance; DEAN, Dennis R.; JOHNSON, Michael K. NifU gene product from *Azotobacter vinelandii* is a homodimer that contains two identical [2Fe-2S] clusters. **Biochemistry**, v. 33, p. 13445–13463, 1994.

GAUDINO, Reginald J.; PIKAARD, Craig S. Cytokinin Induction of RNA Polymerase I Transcription in *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 6799-6804, 1997.

GONG, Zhizhong; LEE, Hojung; XIONG, Liming; JAGENDORF, André; STEVENSON, Becky; ZHU, Jian-Kang. RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 17, p. 11507–11512, 2002.

GONZÁLES, Esteban Roberto. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* via *Agrobacterium***. São Paulo: USP, 2002. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

GUAN, Yue; MANUEL, Raymond C.; ARVAI, Andrew S.; PARIKH, Sudip S.; MOL, Clifford D.; MILLER, Jeffrey H.; LLOYD, R. Stephen; TRAINER, John A. MutY catalytic core, mutant and bound adenine structures define specificity for DNA repair enzyme superfamily. **Nature Structural Biology**, v. 5, p. 1058–1064, 1998.

HINKS, John A.; EVANS, Michael C. W.; DE MIGUEL, Yolanda; SARTORI, Alessandro A.; JIRICNY, Josef; PEARL, Laurence H. An iron-sulfur cluster in the Family 4 uracil-DNA glycosylase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 16936-16940, 2002.

HOSEKI, Jun; OKAMOTO, Akihiro; MASUI, Ryoji; SHIBATA, Takehiko; INOUE, Yorinao; YOKOYAMA, Shigeyuki; KURAMITSU, Seiki. Crystal structure of a Family 4 uracil-DNA glycosylase from *Thermus thermophilus* HB8. **Journal of Molecular Biology**, v. 333, p. 515-526, 2003.

IMSANDE, John. Iron–sulfur clusters: formation, perturbation, and physiological functions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 87–97, 1999.

IPEF - Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. **Brasil *Eucalyptus* Produtividade Potencial (BEPP)**. Disponível em: <<http://www.ipef.br/bepp/>>. Acesso: 22 dez. 2007.

ISHITANI, Manabu; XIONG, Liming; STEVENSON, Becky; ZHU, Jian-Kang. Genetic Analysis of Osmotic and Cold Stress Signal Transduction in *Arabidopsis*: Interactions and Convergence of Abscisic Acid-Dependent and Abscisic Acid-Independent Pathways. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1935–1949, 1997.

ISHIZAKI-NISHIZAWA, Osamu; FUJII, Toshio; AZUMA, Mizue; SEKIGUCHI, Keiko; MURATA, Norio; OHTANI, Takeshi; TOGURI, Toshihiro. Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 1003–1006, 1996.

JACOBSON, Marty R.; CASH, Valerie L.; WEISS, Mary C.; LAIRD, Nancy F.; NEWTON, William E.; DEAN, Dennis R. Biochemical and genetic analysis of the *nifUSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*. **Molecular and General Genetics**, v. 219, p. 49–57, 1989.

JONES, Hamlyn G.; JONES, Michael B. Introduction: some terminology and common mechanisms, in JONES, Hamlyn G.; FLOWERS, Timothy J.; JONES, Michael B. (eds.). **Plants under Stress**, Cambridge: Cambridge University Press, p. 1–10, 1989.

KAISER, Jens T.; CLAUSEN, Tim; BOURENKOW, Gleb P.; BARTUNIK, Hans-D.; STEINBACHER, Stefan; HUBER, Robert. Crystal structure of a NifS-like protein from *Thermotoga maritima*: implications for iron sulphur cluster assembly. **Journal of Molecular Biology**, v. 297, p. 451-464, 2000.

KASAHARA, Hiroyuki; TAKEI, Kentaro; UEDA, Nanae; HISHIYAMA, Shojiro; YAMAYA, Tomoyuki.; KAMIYA, Yuji, YAMAGUCHI, Shinjiro; SAKAKIBARA, Hitoshi. Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 14049–14054, 2004.

KAYAL, Walid El; NAVARRO, Marie; MARQUE, Gilles; KELLER, Guylaine; MARQUE Christiane; TEULIERES, Chantal. Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from *Eucalyptus* in response to cold. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 10, p. 2455–2469, 2006.

KESSLER, Dorothea; PAPENBROCK, Jutta Iron–sulfur cluster biosynthesis in photosynthetic organisms. **Photosynthesis Research**, v.86, p. 391–407, 2005.

KIM, Jong H.; DELAUNEY, Ashton J.; VERMA, Desh Pal S. Control of de novo purine biosynthesis genes in ureide-producing legumes: induction of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase gene and characterization of its cDNA from soybean and Vigna. **The Plant Journal**, v. 7, p. 77-86, 1995.

KISPAL, Gyula; SIPOS, Katalin; LANGE, Heike; FEKETE, Zsuzsanna; BEDEKOVICS, Tibor; JANÁKY, Tamás; BASSLER, Jochen; NETZ, Daili J. Aguiar; BALK, Janneke; ROTTE, Carmen; LILL, Roland. Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron–sulphur protein Rli1p and mitochondria. **The Embo Journal**, v. 24, p. 589–598, 2005.

KISPAL, Gyula; CSERE, Peter; PROHL, Corinna; LILL, Roland. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are required for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. **The Embo Journal**, v. 18, p. 3981–3989, 1999.

KLINGE, Sebastian; HIRST, Judy; MAMAN, Joseph D.; KRUDE, Torsten; PELLEGRINI, Luca. An iron-sulfur domain of the eukaryotic primase is essential for RNA primer synthesis. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 14, n. 9, p. 875–877, 2007.

KNAFF, David B.; HIRASAWA, Masakazu. Ferredoxin-Dependent Chloroplast Enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1056, p. 93–125, 1991.

KNIGHT, Heather; TREWAVAS, Anthony J.; KNIGHT, Marc R. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. **The Plant Cell**, v. 8, p. 489–503, 1996.

KOIWAI, Hanae; NAKAMINAMI, Kentaro; SEO, Mitsunori; MITSUHASHI, Wataru; TOYOMASU, Tomonobu; KOSHIBA, Tomokazu. Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1697–1707, 2004.

KOORNNEEF, Maarten; LEON-KLOOSTERZIEL, Karen M.; SCHWARTZ, Steven H.; ZEEVAART, J.A.D. The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, p. 83–89, 1998.

KUO, Che-Fu; McREE, Duncan E.; FISHER, Cindy L.; O'HANDLEY, Suzanne F.; CUNNINGHAM Richard P.; TAINER, John A. Atomic structure of the DNA repair [4Fe-4S] enzyme endonuclease III. **Science**, v. 258, p. 434–440, 1992.

KUSHIRO, Tetsuo; OKAMOTO, Masanori; NAKABAYASHI, Kazumi; YAMAGISHI, Kazutoshi; KITAMURA, Sayaka; ASAMI, Tadao; HIRAI, Nobuhiro; KASHIBA, Tomokazu; KAMIYA, Yuji; NABMARA, Eiji. The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. **The Embo Journal**, v. 23, p. 1647–1656, 2004.

KUSHNIR, Sergei; BABIYCHUK, Elena; STOROZHENKO, Sergei; DAVEY, Mark W; PAPENBROCK, Jutta; RYCKE, Riet De; ENGLER, Gilbert; STEPHAN, Udo W; LANGE, Heike; KISPAL, Gyula; LILL, Roland; VAN MONTAGU, Marc. A mutation of the mitochondrial ABC transporter Stal leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant *starik*. **The Plant Cell**, v. 13, p. 89–100, 2001.

LAKE, Janice A.; WOODWARD, F. Ian; QUICK, W. Paul. Long-distance CO₂ signalling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 183–193, 2002.

LEVITT, Jacob. **Responses of plants to environmental stresses**. 2.ed. New York: Academic Press, 1980.

LILL, Roland; KISPAL, Gyula. Maturation of cellular Fe–S proteins: an essential function of mitochondria. **Trends in Biochemical Science**, v. 25, p. 352–356, 2000.

LILL, Roland; MÜHLENHOFF, Ulrich. Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, n. 3, p. 133-141, 2005.

LILL, Roland; MÜHLENHOFF, Ulrich. Iron-Sulfur Protein Biogenesis in Eukaryotes: Components and Mechanisms. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 22, p. 457-486, 2006.

LIMA, Walter de Paula. **Impacto ambiental do eucalipto**. São Paulo: EDUSP, 1993.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression data using Real-time quantitative PCR and the Method $2^{-\Delta\Delta CT}$. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOISEAU, Laurent; OLLAGNIER-DE-CHOUDENS, Sandrine; NACHIN, Laurence; FONTECAVE, Marc; BARRAS, Frédéric. Biogenesis of Fe–S cluster by the bacterial Suf system: SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 38352–38359, 2003.

LUKIANOVA, Olga A.; DAVID, Sheila S. A role for iron–sulfur clusters in DNA repair. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 145–151, 2005.

LYNCH, Daniel V.; THOMPSON JR., Guy A. Low temperature-induced alterations in the chloroplast and microsomal membrane of *Dunaliella salina*. **Plant Physiology**, v. 69, p. 1369–1375, 1982.

MAHAJAN, Shilpi; TUTEJA, Narendra. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, p. 139–158, 2005.

MANSFIELD, Terence Arthur; ATKINSON, Christopher J. Stomatal behaviour in water stressed plants, *in* ALSCHER, Ruth G.; CUMMING, Jonathan R. (eds.). **Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms**, New York: Wiley-Liss, p. 241–264, 1990.

MARSH, E. Neil G.; PATWARDHAN, Anjali; HUHTA, Marja S. S-adenosylmethionine radical enzymes. **Bioorganic Chemistry**, v. 32, p. 326–340, 2004.

MIAO, Yuchen; LV, Dong.; WANG, Penhcheng; WANG, Xue-Chen; CHEN, Jia; MIAO, Chen; SONG, Chung-Peng. An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. **The Plant Cell**, v. 18, p. 2749-2766, 2006.

MISHRA, Girish; ZHANG, Wenhua; DENG, Fan; ZHAO, Jian; WANG, Xuemin. A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. **Science**, v. 312, p. 264-266, 2006.

MURTHY, Narayana; OLLAGNIER-DE-CHOUDENS, Sandrine; SANAKIS, Yiannis; ABDEL-GHANY, Salah E.; ROUSSET, Carine; YE, Hong; FONTECAVE, Marc; PILON-SMITS, Elizabeth A. H.; PILON, Marinus. Characterization of *Arabidopsis thaliana* SufE2 and SufE3: Functions in Chloroplast Iron-Sulfur Cluster Assembly and NAD Synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 18254–18264, 2007.

NACHIN, Laurence; EL HASSOUNI, Mohammed; LOISEAU, Laurent; EXPERT, Dominique; BARRAS, Frédéric. SoxR-dependant response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*: the key role of SufC, an orphan ABC ATPase. **Molecular Microbiology**, v. 39, p. 960–972, 2001.

NAMBARA, Eiji; MARION-POLL, Annie. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 165-185, 2005.

NEMANI, Ramakrishna; GHAZARIAN, Jacob G.; MOORTHY, Bhagavatula; WONGSURAWAT, Nirandon; STRONG, Randy; ARMBRECHT, H. James. Phosphorylation of ferredoxin and regulation of renal mitochondrial 25- hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase activity *in vitro*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 15361–15366, 1989.

PARIDA, Asish Kumar; DAS, Anath Bandhu. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60 p. 324–349, 2005.

PEARL, Laurence H. Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily. **Mutation Research**, v. 460, p. 165-181, 2000.

PEREIRA, José Carlos Duarte; STURION, José Alfredo; HIGA, Antonio Royei; HIGA, Rosana Clara Victória; SHIMIZU, Jarbas Yukio **Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000.

RÁCZ, Ilona; PÁLDI, Emil; SZALAI, Gabriella; JANDA, Tibor; PÁL, Magdolna; LÁSZTITY, Demeter. S-methylmethionine reduces cell membrane damage in higher plants exposed to low-temperature stress. **Journal of Plant Physiology**, doi 10.1016/j.jplph.2006.03.020, 2008.

RAMANJULU, Sunkar; BARTELS, Dorothea. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 141-151, 2002.

RATHINASABAPATHI, Bala; BURNET, Michael; RUSSEL, Brenda L.; GAGE, Douglas A.; LIAO, Pao-Chi; NYE, Gordon J.; SCOTT, Paul; GOLBECK, John H.; HANSON, Aandrew D. Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: Prosthetic group characterization and cDNA cloning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 3454-3458, 1997.

RAVEN, John A.; EVANS, Michael C. A.; KORB, Rebecca E. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. **Photosynthesis Research**, v. 60, p. 111-150, 1999.

REBEIL, Roberto; NICHOLSON, Wayne L. The subunit structure and catalytic mechanism of the Bacillus subtilis DNA repair enzyme spore photoproduct lyase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 16, p. 9038–9043, 2001.

Revista da Madeira, Curitiba, REMADE - Portal Nacional da Madeira, n. 92, out. 2005. Disponível em: <http://www.remade.com.br/pt/revista_materia.php?edicao=92&id=803>. Acesso: 06 jan. 2008.

_____, Curitiba, REMADE - Portal Nacional da Madeira, n. 107, set. 2007. Disponível em: <http://www.remade.com.br/pt/revista_materia.php?edicao=107&id=1132>. Acesso: 06 jan. 2008.

_____, Curitiba, REMADE - Portal Nacional da Madeira, n. 108, out. 2007. Disponível em: <http://www.remade.com.br/pt/revista_materia.php?edicao=108&id=1154>. Acesso: 06 jan. 2008.

SAGI Moshe; SCAZZOCCHIO Claudio; FLUHR Robert. The absence of molybdenum cofactor sulfuration is the primary cause of the *flacca* phenotype in tomato plants. **The Plant Journal**, v. 31, p. 305–317, 2002.

SANDIGURSKY, Margarita; FRANKLIN, William A. Thermostable uracil-DNA glycosylase from *Thermotoga maritima*, a member of a novel class of DNA repair enzymes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 531-534, 1999.

SANTOS, Suzana Neiva. **Genes de lignificação de *Eucalyptus*: estrutura e diversidade genética dos genes 4cl e ccoaomt**. Brasília: UCB, 2005, 208 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2005.

SCHUPPLER, Ute; HE, Ping-Hua; JOHN, Peter C. L.; MUNNS, Rana. Effects of water stress on cell division and cell-division-cycle-2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. **Plant Physiology**, v. 117, p. 667–678, 1998.

SEKIMOTO, Hiroyuki; SEO, Mitsunori; DOHMAE, Naoshi.; TAKIOI, Koji; KAMIYA, Yuji; KOSHIBA, Tomokazu. Cloning and molecular characterization of plant aldehyde oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 15280-15285, 1997.

SEO, Mitsunori.; KOIWAI, Hanae.; AKABA, Shuichi.; KOMANO, Teruya.; ORITANI, Takayuki.; KAMIYA, Yuji; KOSHIBA, Tomokazu. Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 23, n. 4, p. 481–488, 2000.

SEO, Mitsunori; AOKI, Hiroyuki; KOIWAI, Hanae; KAMIYA, Yuji; NAMBARA, Eiji; KOSHIBA, Tomokazu. Comparative studies on the *Arabidopsis* aldehyde oxidase (AAO) gene family revealed a major role of AAO3 in ABA biosynthesis in seeds. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, p. 1694–1703, 2004.

SHARMA, Suraj P.; KAUR, Jaspal; RATTAN, Suresh I. S. Increased longevity of kinetin-fed *Zaprionus* fruitflies is accompanied by their reduced fecundity and enhanced catalase activity. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 41, p. 869-875, 1997.

SHINOZAKI, Kazuo; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 217-223, 2000.

SONOIKE, Kintake. Various Aspects of Inhibition of Photosynthesis under Light/Chilling Stress: "Photoinhibition at Chilling Temperatures" versus "Chilling Damage in the Light" **Journal of Plant Research**, v. 111, p. 121-129, 1998.

SUH, Hwa-Jin; KIM, Chang Sook; JUNG, Jin. Cytochrome b6/f complex as an indigenous photodynamic generator of singlet oxygen in thylakoid membranes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 71, p. 103-109, 2000.

SUN, Feifei; ZHANG, Wensheng; HU, Haizhou; LI, Bao; WANG, Youning; ZHAO, Yankun; LI, Kexue; LIU, Mengyu; LI, Xia. Salt Modulates Gravity Signaling Pathway to Regulate Growth Direction of Primary Roots in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 146, p. 178–188, jan. 2008.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAKAHASHI, Yasuhiro; TOKUMOTO, Umechiyo. A third bacterial system for the assembly of iron–sulfur clusters with homologs in Archaea and plastids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 28380–28383, 2002.

TERASHIMA, Ichiro, HUANG, Lin-Ke; OSMOND, C. Barry. Effects of leaf chilling on thylakoid functions, measured at room temperature, in *Cucumis sativus* L. and *Oryza sativa* L. **Plant and Cell Physiology**, v. 30, n. 6, p. 841-850, 1989.

THOMASHOW, Michael F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 571–599, 1999.

_____. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! **Plant Physiology**, v. 125, p. 89–93, 2001.

TOKUHISA, James G.; BROWSE John A. Genetic engineering of plant chilling tolerance. **Genetic Engineering**, v. 21, p. 79–93, 1999.

TOKUHISA, James G.; VIJAYAN, Perumal; FELDMANN, Kenneth A; BROWSE, John A. Chloroplast development at low temperatures requires a homolog of DIM1, a yeast gene encoding the 18S rRNA dimethylase. **The Plant Cell**, v. 10, p. 699–711, 1998.

VASHISHT, Ajay Amar, TUTEJA, Narendra. Stress responsive DEAD-box helicases: A new pathway to engineer plant stress tolerance. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 84, p. 150–160, 2006.

VERSLUES, Paul E.; ZHU, Jian-Kang. New developments in abscisic acid perception and metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 447–452, 2007.

VINOCUR, Basia; ALTMAM, Arie. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 123–132, 2005.

WÄCHTERSCHÄUSER, Günter. Groundworks for an evolutionary biochemistry – the iron sulfur world. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 58, p. 85-201, 1992.

WANG, Wangxia; VINOCUR, Basia; ALTMAN, Arie. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, p. 1-14, 2003.

WATSON, Mark B.; EMORY, Kimberly K.; PIATAK, Ruth Marie; MALMBERG, Russel L. Arginine decarboxylase (polyamine synthesis) mutants of *Arabidopsis thaliana* exhibited altered root growth. **The Plant Journal**, v. 13, p. 231-239, 1998.

WILKINSON, Sally; DAVIES, Willian J. ABA-based chemical signalling: the coordination of responses to stress in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 195–210, 2002.

WU, Jingrui, LIGHTNER, Jonathan, WARWICK, Nigel; BROWSE John A. Low-Temperature Damage and Subsequent Recovery of *fab1* Mutant Arabidopsis Exposed to 2[deg]C. **Plant Physiology**, v. 113, p. 347–356, 1997.

XIONG, Liming; ISHITANI, Manabu; LEE, Hojoung; ZHU, Jian-Kang.; The *Arabidopsis* *LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. **The Plant Cell**, v. 13, p. 2063–2083, 2001.

XIONG, Liming; SCHUMAKER, Karen S.; ZHU, Jian-Kang. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **The Plant Cell**, v. 14, p. 165-183, 2002.

YABE, Toshiki; MORIMOTO, Kozo; KIKUCHI, Shingo; NISHIO, Kazuaki; TERASHIMA, Ichiro; NAKAI, Masato. The Arabidopsis chloroplastic NifU-like protein CnfU, which can act as an iron-sulfur cluster scaffold protein, is required for biogenesis of ferredoxin and photosystem I. **The Plant Cell**, v. 16, p. 993–1007, 2004.

YANG, Juanjuan; BITOUN, Jacob P.; DING, Huang. Interplay of IscA and IscU in Biogenesis of Iron-Sulfur Clusters. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 1-17, 2006.

YE, Hong; PILON, Marinus; PILON-SMITS, Elizabeth A. H. CpNifS- dependent iron-sulfur cluster biogenesis in chloroplasts. **New Phytologist**, v. 171, p. 285-292, 2006.

YUVANIYAMA, Pramvadee; AGAR, Jeffrey N.; CASH, Valerie L.; JOHNSON, Michael K.; DEAN, Dennis R. NifS-directed assembly of a transient [2Fe–2S] cluster within the NifU protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 599–604, 2000.

ZEEVAART, Jan A. D. Abscisic acid metabolism and its regulation, *in* HOOYKAAS, Paul J. J.; HALL, Michael A.; LIBBENGA, Kees R. (eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones**, Amsterdam: Elsevier Science, p. 189–207. 1999.

ZHENG, Limin; CASH, Valerie L.; FLINT, Dennis H.; DEAN, Dennis R. Assembly of Iron-Sulfur Clusters. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 13264-13272, 1998.

ZHENG, Limin; WHITE, Robert H.; CASH, Valerie L.; JACK, Richard F.; DEAN, Dennis R. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 2754–2758, 1993.

ZHENG, Limin; WHITE, Robert H.; CASH, Valerie L.; DEAN, Dennis R. Mechanism for the Desulfurization of L-Cysteine Catalyzed by the nifS Gene Product. **Biochemistry**, v. 33, p. 4714-4720, 1994.

ZHU, Jian-Kang. Cell signaling under salt, water and cold stresses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 401-406, 2001.

_____. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 2, p. 66-71, 2001b.

_____. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247-273, 2002.

ANEXO “A”



Plântulas de *E. grandis* após o resfriamento.

ANEXO “B”

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

Eucalyptus      MAAPSA-SKLA AAAADRFGSAAR----RQVLTVTD AAA SRIRHLL QQRQRPFLRLGVKARG 55
Arabidopsis    MKAS---QI LAAAAARVGPALR----KQVLTLTDEAASRVHLL QQRQKPFRLRGVKARG 53
Populus        MAASRASKL FAAAAEAVGSSAR----KQVLSLTD AAATRIRDLL QQRKRPFLRLGVKARG 56
10ryza        MSSS---AALALALRRATS SAHKQKQKQALALTD AAA SRIRQLL SLRHRPYLRLGVKARG 57
20ryza        MSSS---AALALALRRATS SAHKQKQKQALALTD AAA SRIRQLL SLRHRPYLRLGVKARG 57
* :.          :* *          .: :          :*.**:** ***:**:.** .*:**:*
*****

Eucalyptus      CNGL SYTLNYADSKGKFDE LVEDKGIKIL VEPKALMHVI GTKMD FVDDKLR----- 106
Arabidopsis    CNGL SYTLNYADEK GK FDE LVEEKGVRI L VEPKALMHVI GTKMD FVDDKLR----- 104
Populus        CNGL SYTLNYADEK GK FDE LVEDKGVKIL IDPKALMHVI GTKMD FVDDKLR----- 107
10ryza        CNGL SYTLNYADEK GK FDE VVEDKGVKVL IDPKALMHVI GTKMD YVDD PLR----- 108
20ryza        CNGL SYTLNYADEK GK FDE VVEDKGVKVL IDPKAVMHVI STKMD YVDD PLRFMICAQHFL 117
*****.*****:**:**:***:****:****.****:*** **

Eucalyptus      -----SE FIFINPNSKGQCGCGESFMTTNSDA AKRGG S 140
Arabidopsis    -----SE FVFINPNSQGQCGCGESFMTTSTS- SAKQSAS 137
Populus        -----SE FIFINPNSKGQCGCGESFMTRSSSTTAKGG S 141
10ryza        -----SE FVFINPNSKGE CGCGESFMTTSSKGSTS---- 138
20ryza        LSTYYLLSL PYGGFSCRSE FVFINPNSKGE CGCGESFMTTSSKGSTS---- 164
*****

```

Alinhamento das seqüências protéicas de ISA1. Em azul, as cisteínas conservadas.

ANEXO “C”

```

Eucalyptus      MLRLGAKKLAG-----LAGAAAGPARVV PPLRLYHERVVDHYNNPRNVGSFDKNDPAVG 54
Arabidopsis    MLKQAAKALG-----LTSRQSTP-WSVSI FRTYHENVIDHYDNPRNVGSFDKNDPNVG 53
Populus        MLRLLASERLL-----LSQR-----TRILPRFYHEKVIDHFNNPRNVGSFDKNDPAVG 48
Medicago      MLRIAKKLVQT-----ASFETPNP-AIRVLP RFYHERVVDHYDNPRNVGSFDKNDPTVG 53
10ryza         MLRAGGRRLAPGLRRVLGGGAAAP-VAVGGAKAYHERVVDHYENPRNVGSFENDDPSVG 59
20ryza         MLRAGGRRLAPGLRRVLGGGAAAP-VAVGGARAYHERVVDHYENPRNVGSFENDDPSVG 59
**:                                     : **.*:***:*****:*** **

Eucalyptus      TGLVGAPACGDVMK LQIKVDEETGKIVDARFKTFGC GSAIASSSVATEWVKGKQMEEVLS 114
Arabidopsis    TGLVGAPACGDVMK LQIKVDEKTGQIVDARFKTFGC GSAIASSSVATEWVKGKAMEDVLT 113
Populus        TGLVGAPACGDVMK LQIKVDDTTGEIIDARFKTFGC GSAIASSSVATEWVKGKQMEEVMT 108
Medicago      TGLVGAPACGDVMK LQIKVDEN-GKIIDARFKTFGC GSAIASSSVATEWVKGKQMEEVLT 112
10ryza         TGLVGAPACGDVMK LQIRVDESSGKIVDACFKTFGC GSAIASSSVATEWVKGKQMEEVVT 119
20ryza         TGLVGAPACGDVMK LQIRVDESSGKIVDACFKTFGC GSAIASSSVATEWVKGKQMEEVVT 119
*****:***: *:*:** ***** **:*:

Eucalyptus      IKNTEIAKHL SLPPVKLHC SMLAEDA IKA AVKDY EAKRAKLDGSDSAKDAPLEKAADA 173
Arabidopsis    IKNTEIAKHL SLPPVKLHC SMLAEDA IKA AVKDY KEKRVKTINGAAAAGETTQA----- 166
Populus        IKNTEIAKHL SLPPVKLHC SMLAEDA IKA AVKDY QTKRAKLSGVSETEPVEQAAQA--- 164
Medicago      IKNTEIAKHL SLPPVKLHC SMLAEDA IKA AVKDY EAKRASATAATGDKSATA----- 164
10ryza         IKNTEIAKHL SLPPVKLHC SMLAEDA IKA AVKDY EAKKAKLAQKGEEKAAEA----- 171
20ryza         IKNTEIAKHL SLPPVKLHC SMLAEDA IKA AVKDY EAKKAKLAQKGEEKAAEA----- 171
*****:***: *:*:** ***** **:*:

```

Alinhamento das seqüências protéicas de ISU1. Em azul, as cisteínas conservadas.

ANEXO “D”

```

Populus      RRRPRIRVE PQMNGGGQERGIRSGTVPTP LVVGMGAACE LAKKE MEYDDKRIRALHERML 60
Vitis       RRRPRIRVE PQMNGGGQERGIRSGTVPTP LVVGMGAACE LAMKE MEYDDKRISXLQERLL 60
Arabidopsis RRRPRIRLE PLMNGGGQERGLRSGTGATQ QIVGF GAACE LAMKE MEYDEKWKIKGLQERLL 60
Eucalyptus  --RPRIRVE PQMNGGGQERGIRSGTVPTP LVVGMGAACE LAMKE MEYDDRRISALQERLL 58
10ryza     RRRPRIRVE PQMSGGGQERGIRSGTVPTP LVVGF GAACE IAAKE MDYDHRRASVLQQRLL 60
20ryza     RRRPRIRVE PQMSGGGQERGIRSGTVPTP LVVGF GAACE IAAKE MDYDHRRASVLQQRLL 60
          *****: ** * .*****: ***** * : ** : *****: * ***: **.: * : * : *

Populus      NGVRAKLDG VV VNG SVERRYAGNLNLSFAYVEGE SLLMGLKDVAVSSGSACTSASLEPSY 120
Vitis       NGXKAKLDG VV VNG SKEKRYAGNLNLSFAYVEGE SLLMGLKEVAVSSGSACTSASLEPSY 120
Arabidopsis NGVREKLDG VV VNG SMDSRYPGNL NLSFAYVEGE SLLMGLKEVAVSSGSACTSASLEPSY 120
Eucalyptus  NGIRGKIDG VV VNG SMERRYTGNLNLSFAYVEGE SLLMGLKEVAVSSGSACTSASLEPSY 118
10ryza     DGIRGQVDD I VING SMEHRYPGNL NLSFAYVEGE SLLMGLKEVAVSSGSACTSASLEPSY 120
20ryza     DGIRGQVDD I VING SMEHRYPGNL NLSFAYVEGE SLLMGLKEVAVSSGSACTSASLEPSY 120
          : * : : * . : * : *** : ** *****: *****: *****

Populus      VLRALGVDEDMAHTSIRFGIGRFTTEEEIDRAIE LTVQQVEKLREMSPLYEMVKEGIDIK 180
Vitis       VLRALGVDEDMAHTSIRFGIGRFTTEAEIDRAVE LTVQQVEKLREMSPLYEMVKEGIDIK 180
Arabidopsis VLRALGVDEDMAHTSIRFGIGRFTTKEEIDKAVE LTVKQVEKLREMSPLYEMVKEGIDIK 180
Eucalyptus  VLRALGVEEDMAHTSIRYIGRFTTEEEIDRAVE LTVQQVEKLREMSPLYEMVKDGIDIK 178
10ryza     VLRALGVEEDMAHTSIRFGIGRFTTEEEVDRAIE LTVHQVKKLRDMSPLYEMAKAGIDLK 180
20ryza     VLRALGVEEDMAHTSIRFGIGRFTTEEEVDRAIE LTVHQVKKLRDMSPLYEMAKAGIDLK 180
          *****: *****: *****: * : * : * : *****: ** : *** : *****: * ***: *

Populus      QIQWAQH 187
Vitis       SIQWAQH 187
Arabidopsis NIQWSQH 187
Eucalyptus  SIQWAQH 185
10ryza     SIQWAQH 187
20ryza     SIQWAQH 187
          .***: **

```

Alinhamento da porção C- terminal da proteína NFS1 . Em azul, a cisteína conservada.