



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

KENIA DE CARVALHO

**“ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM  
ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CITRUMELEIRO ‘SWINGLE’  
COM ALTO ACÚMULO DE PROLINA SUBMETIDO AO  
DÉFICIT HÍDRICO.”**

KENIA DE CARVALHO

**“ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM  
ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CITRUMELEIRO ‘SWINGLE’  
COM ALTO ACÚMULO DE PROLINA SUBMETIDO AO  
DÉFICIT HÍDRICO.”**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira

Londrina  
2009

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

C331a Carvalho, Kenia de.

Análise da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes em citrume-leiro Swingle com alto acúmulo de prolina submetido ao déficit hídrico / Kenia de Carvalho. – Londrina, 2009.  
141 f. : il.

Orientador: Luiz Gonzaga Esteves Vieira.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia vegetal – Teses. 2. Enzimas – Genética – Expressão – Teses. 3. Genética vegetal – Teses. 4. Prolina – Teses. I. Vieira, Luiz Gonzaga Esteves. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 581.169

KENIA DE CARVALHO

**“ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM ENZIMAS  
ANTIOXIDANTES EM CITRUMELEIRO ‘SWINGLE’ COM ALTO  
ACÚMULO DE PROLINA SUBMETIDO AO DÉFICIT HÍDRICO.”**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira  
IAPAR – Londrina - PR

---

Prof. Dr. Alexandre Lima Nepomuceno  
EMBRAPA Soja – Londrina - PR

---

Prof. Dr. Luiz Filipe Protassio Pereira  
Embrapa Café

Londrina, 20 de fevereiro de 2009.

## DEDICATÓRIA

*Dedico...*

*Aos meus pais Dulce e Devanir, meu irmão Evandro e meu padrasto Hélio, por  
todo apoio, incentivo e paciência ..... com todo o meu amor!*

“Depois que cumprimos nossa função, somos descartados. Mas os genes são para sempre.”

Richard Dawkins

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina e a todos os docentes do curso.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) pelo uso das instalações.

Ao Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira pela confiança, paciência, dedicação, incentivo, além das valiosas horas de cafezinho de onde o quadro nunca saia branco. E é claro, pelos ensinamentos valiosos, dentre os mais famosos.....LEIA PAPER!!! Você é o minha referência de pesquisador e me orgulho muito de trabalhar com você.

Ao Dr. Luiz Filipe Protássio Pereira pela disponibilidade, esclarecimentos e sugestões.

Ao Dr. Alexandre Nepomuceno por participar da banca e contribuir grandemente para a finalização deste trabalho.

Ao Dr. Fábio Suano de Souza e Dr. Celso Jamil Marur pela colaboração nos experimentos e análise de dados.

Á Marília K. F. de Campos (Lila = Prolila) pela amizade, companheirismo, paciência, apoio psicológico, reestruturação alimentar, abrigo em períodos de reforma, enfim, são tantas coisas que minha gratidão ocuparia metade desta dissertação. Meu mestrado não teria sido a mesma coisa sem você por perto. Duas frases pra você: "I Kill you" e "Location, location, location". Grande parte das minhas conquistas devo a você.

Á Gislaine Vasquez por cuidar de mim, pela disponibilidade, amizade, carinho, preocupação, companheirismo, exemplo de vida.

À Sandra Maria Belodi Cação pela amizade, risadas, conselhos, ensinamentos, dedicação

Ao Tiago Benedito pela amizade, por ter trilhado esses últimos dois anos junto comigo de maneira tão agradável e divertida.

À Sueli por controlar muito bem o estoque e pela amizade.

À Lúcia pela gentil concessão de kits real time.

Ao Diogo (Dom) por compartilhar a sala, a internet e as músicas.

Aos amigos do LBI, minha segunda família.

Ao Clelton Aparecido dos Santos e Marcos (Marquinhos) pela amizade, companheirismo, diversão e cerveja.

Ao João por cuidar sempre muito bem das plantas.

Á Sueli Trindade Miranda pela disponibilidade e paciência. Á minha família pelo apoio incondicional. À Capes pela concessão da bolsa. Á Marcinha e Paquita por tornar o meu trabalho ainda mais agradável.

CARVALHO, Kenia de. “Análise da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes em citrumeleiro ‘swingle’ com alto acúmulo de prolina submetido ao déficit hídrico.” 2009. 141 f. Dissertação (Mestrado em Genética Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## RESUMO

Condições de estresse abiótico levam ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio com o concomitante aumento da atividade de enzimas antioxidantes em plantas. Estudos anteriores mostraram que aplicações exógenas de prolina amenizam os efeitos deletérios causados pelo estresse oxidativo devido à sua habilidade de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes. Entretanto, não existem relatos dos efeitos da acumulação endógena de prolina na expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes em condições normais de suprimento de água e em resposta ao déficit hídrico. O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão relativa de transcritos de genes de quatro enzimas antioxidantes (Ascorbato peroxidase - APX, Catalase - CAT, Superóxido dismutase - SOD e Glutathione redutase - GR) em plantas transgênicas de citrumeleiro Swingle com alto acúmulo de prolina submetido ao déficit hídrico. Primeiramente, para a identificação dos genes apropriados para utilizar como controle interno em tratamentos experimentais em condições de estresse hídrico por PCR em Tempo Real foi analisada a expressão de sete genes housekeeping funcionalmente distintos (ciclofilina - CYP, catepsina - CtP, actina - ACT, glucose-6-fosfato desidrogenase - GAPDH, fator de alongamento 1 $\alpha$  - EF1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina -  $\beta$ -TUB e ADP- fator de ribosilação - ADP). A estabilidade de expressão destes genes foi calculada através do software geNorm, a partir do qual foi verificado que o gene EF1 $\alpha$  é o mais adequado. A partir do banco de dados HarvEST Citrus foram obtidas sequências de isoformas altamente expressas dos genes APX (ascorbato peroxidases APX1 e APX2 citosólicas e APXCL de cloroplasto), CAT (catalases CAT1 e CAT2), GR (glutathione redutases citosólica e GRCL de cloroplasto) e SOD (superóxido dismutases Cu/ZnSOD1 e Cu/ZnSOD2 citosólicas, Cu/ZnSODCL de cloroplasto, MnSOD mitocondrial e FeSOD cloroplasto). Plantas controle não transformadas e transgênicas com o gene mutante *P5CSF129A* foram submetidas à deficiência hídrica até atingirem a condição de estresse severo, e posteriormente recuperadas. A coleta de folhas foi baseada em valores semelhantes de potencial total de água: condições normais de suprimento de água ( $\Psi_t = -1,3$  MPa), estresse moderado ( $\Psi_t = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), estresse severo ( $\Psi_t = -3,8$  a  $-3,9$  MPa) e recuperado (24h após irrigação;  $\Psi_t = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). A alta quantidade de prolina presente em plantas de citrumeleiro Swingle expressando o gene *P5CSF129A* induziu maior atividade transcricional da maioria das isoformas analisadas em condições normais de suprimento de água. Nesta condição, as isoformas cujo aumento de expressão foi mais significativo foram as *APX1*, *APXCL*, *CuZnSOD2* e *CAT2*. Durante o período de déficit hídrico a prolina apresentou maior influência sobre a expressão das isoformas *APX1*, *APX2*, *APXCL*, *MnSOD* e *GRCL*, com a elevação nos níveis de transcritos. Já durante a recuperação do estresse, as isoformas cuja expressão foi aumentada em plantas transgênicas foram *APX1*, *CAT1*, *CuZnSODCL* e *GRCL*. Estes dados demonstram que o alto acúmulo de prolina em plantas transgênicas de citrumeleiro Swingle alterou a transcrição de genes de enzimas antioxidantes tanto em condições normais de suprimento de água

como sob déficit hídrico. Os efeitos da prolina na atividade de enzimas antioxidantes, como APX, CAT e SOD já foram objeto de vários estudos, porém são escassos os trabalhos que mostram a influência da alta concentração intracelular deste aminoácido na expressão dos genes que codificam estas enzimas. Os resultados aqui relatados também fornecem informações inéditas para o entendimento da regulação de processos biológicos em resposta a estresses abióticos, mostrando que a prolina pode atuar como uma molécula regulatória/sinalizadora capaz de alterar a expressão de genes envolvidos nas respostas das plantas a condições de déficit hídrico.

**Palavras – chave:** Biotecnologia vegetal. Enzimas. Genética. Expressão. Genética vegetal. Prolina.

CARVALHO, Kenia de. **Analysis of the expression of genes encoding antioxidant enzymes in 'swingle' high accumulation of proline submitted to the deficit.** 2009. 141 f. Dissertation (Master's degree in Genetic Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## ABSTRACT

Abiotic stress Conditions leads to an accumulation of reactive oxygen species with the concomitant increase in antioxidant enzymes activity in plants. Previous studies showed that exogenous application of proline mitigate the deleterious effects caused by oxidative stress due to its ability to increase the activity of antioxidant enzymes. However, there are no reports of the effects of endogenous accumulation of proline in genes expression encoding antioxidant enzymes under normal conditions of water supply and in response to water deficit. The objective of this study was to analyze relative expression of transcripts of four antioxidant enzymes genes (Ascorbate peroxidase – APX, Catalase – CAT, Superoxide dismutase – SOD and Glutathione reductase – GR) in citrumelo Swingle transgenic plants with high proline accumulation subjected to water deficit. First of all, for the identification of suitable genes for use as internal controls in experimental treatments in conditions of water stress by Real Time PCR the expression of seven functionally distinct housekeeping genes was analyzed (cyclophilin – CYP, cathepsin – CtP, actin – ACT, GAPDH, elongation factor 1- $\alpha$  – EF1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin – $\beta$ -TUB and ADP- ribosylation factor – ADP). The expression stability of these genes was calculated through geNorm software, where it was found that EF1 $\alpha$  gene was the most appropriate for normalization data. From the HarvEST Citrus database ([www. http://harvest.ucr.edu/](http://harvest.ucr.edu/)) highly expressed sequences of APX (cytosolic *ascorbate peroxidases* APX1 and APX2 and chloroplastic APX), CAT (*catalases* CAT1 and CAT2), GR (cytosolic *glutathione reductases* and chloroplastic GR) and SOD (cytosolic *superoxide dismutases* Cu/ZnSOD1 and Cu/ZnSOD2, chloroplastic Cu/ZnSOD, mitochondrial MnSOD and chloroplastic FeSOD) genes were selected. Transgenic expressing the mutant gene P5CSF129A and control plants were submitted to drought until they reach severe stress condition, after when plants were recovered. Leaves collection were made based on similar water potential values: normal conditions of water supply ( $\Psi_t = -1,3$  MPa), moderated stress ( $\Psi_t = -2,5$  MPa), severe stress ( $\Psi_t = -3,9$  MPa) and recovered ( $\Psi_t = -1,9$  MPa). The high accumulation of proline present in citrumelo Swingle plants expressing the mutant gene P5CSF129A induced higher transcriptional activity in the majority of the isoforms tested under normal water supply conditions. In this condition, isoforms expression with more significant increase were APX1, APXCL, CuZnSOD2 and CAT2. During drought stress proline had higher performance on the isoforms APX1, APX2, APXCL, MnSOD and GRCL giving rise in transcripts levels. During recovery, isoforms whose expression was increased in transgenic plants were APX1, CAT1, CuZnSODCL and GRCL. These data demonstrate that high accumulation of proline in citrumelo Swingle transgenic plants altered genes transcription of antioxidant enzymes both in normal water supply conditions and under water deficit. Proline effect in the antioxidant enzymes activity, like APX, CAT and SOD have been object of several studies, however there are few studies showing the influence of high intracellular concentration of this aminoacid in genes expression encoding these enzymes. The results reported here provide novel information for understading regulation of biological processes in response to abiotic stresses, showing that proline can act as a regulatory/signalling molecule capable of altering expression of genes involved in plants responses to water deficit conditions.

**Keywords:** Crop biotechnology. Enzymes. Genes. Expression. Plant genetics. Proline.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Formação de radicais livres a partir de oxigênio molecular.....21
- Figura 2** – Via de síntese e degradação de prolina em plantas ..... 33
- Figura 3** – Representação esquemática da produção e remoção de espécies reativas de oxigênio em plantas. Kuzniak, E. (2002) ..... 37
- Figura 4** – Reação catalisada pela superóxido dismutase (SOD).....41
- Figura 5** – Duas das maiores vias para o metabolismo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plantas.....42
- Figura 6** – Estabilidade de expressão gênica dos genes normalizadores candidatos. Baixos valores de M indicam maior estabilidade. *β-TUB* (β-tubulina), *ACT* (actina), *CYP* (ciclofilina) *CtP* (catepsina), *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *EF1α* (fator de alongamento 1α), e *ADP* (ADP-ADP-fator de ribosilação).....61
- Figura 7** – Avaliação do número ótimo de genes normalizadores. O valor V<sub>2/3</sub> abaixo de 0,15 indica a não necessidade da adição de um terceiro gene normalizador.....62
- Figura 8** – Principais modos de remoção de ROS. A SOD converte radicais superóxido em peróxido de hidrogênio. Catalases (CAT) convertem o peróxido em água. O peróxido de hidrogênio também pode ser convertido em água pelo ciclo ascorbato-glutationa. O agente redutor na primeira reação catalisada pela APX é o ascorbato, o qual oxida em monodeidroascorbato (MDA). A MDA redutase (MDAR) reduz MDA em ascorbato com o auxílio de NAD(P)H. A desidroascorbato (DHA) é produzida espontaneamente pelo MDA e pode ser reduzida a ascorbato pela DHA redutase (DHAR) com a utilização de glutathione (GSH) que é oxidada a glutathione oxidada (GSSG). O ciclo é fechado com a glutathione redutase (GR) convertendo a GSSG novamente em GSH com o agente redutor NAD(P)H. O ciclo glutathione peroxidase (GPX)

	converte peróxido de hidrogênio em água. A glutaciona oxidada é novamente convertida em glutaciona pela GR e o agente redutor NAD(P)H.....	71
<b>Figura 9 –</b>	Dendrograma de similaridade de genes de três isoformas da enzima ascorbato peroxidase ( <i>APX1</i> , <i>APX2</i> e <i>APX</i> cloroplasto) de <i>Citrus</i> spp. com <i>APXs</i> de <i>Vitis vinifera</i> , <i>Populus trichocarpa</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> e <i>Oryza sativa</i> .....	81
<b>Figura 10 –</b>	Dendrograma de similaridade de genes de duas isoformas da enzima catalase ( <i>CAT1</i> e <i>CAT2</i> ) de <i>Citrus</i> spp. com genes de <i>CAT</i> de <i>Vitis vinifera</i> , <i>Populus trichocarpa</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Oryza sativa</i> e <i>Prunus pérsica</i> .....	81
<b>Figura 11 –</b>	Dendrograma de similaridade de genes de cinco isoformas da enzima superóxido dismutase de <i>Citrus</i> spp. com genes de <i>SOD</i> de <i>Vitis vinifera</i> , <i>Populus trichocarpa</i> , <i>Citrus limon</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Oryza sativa</i> e <i>Prunus pérsica</i> .....	82
<b>Figura 12 –</b>	Dendrograma de similaridade de genes de duas isoformas da enzima glutaciona redutase ( <i>GR</i> e <i>GRCL</i> ) de <i>Citrus</i> spp. com genes de <i>GR</i> de <i>Vitis vinifera</i> , <i>Populus trichocarpa</i> , <i>Arabidopsis thalian</i> e <i>Oryza sativa</i> .....	83
<b>Figura 13 –</b>	Conteúdo de prolina livre em folhas de plantas controle não-transformadas e de plantas transgênicas contendo o gene <i>P5CSF129A</i> em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_w = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_w = -2,3$ a $-2,5$ MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_w = -3,8$ a $-3,9$ MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação; $\Psi_w = -1,3$ a $-1,9$ MPa). Valores são apresentados por médias $\pm$ erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam colunas de padrões diferentes e letras minúsculas comparam colunas de mesmo padrão. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.....	84

- Figura 14** – Conteúdo de MDA em folhas de plantas controle não-transformadas e de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam colunas de padrões diferentes e letras minúsculas comparam colunas de mesmo padrão. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade..... 85
- Figura 15** – Níveis de transcrição do P5CS nativo (*CsP5CS*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão (n=3)..... 86
- Figura 16** – Níveis de transcrição do *P5CS* transgene (*P5CSF129A*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão. O calibrador utilizado neste caso foi o tratamento sem estresse de plantas transgênicas (n=3)..... 86
- Figura 17** – Níveis de transcrição da ascorbato peroxidase 1 (*APX1*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão (n=3)..... 87
- Figura 18** – Níveis de transcrição da ascorbato peroxidase 2 (*APX2*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;

$\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão (n=3) ..... 88

**Figura 19** – Níveis de transcrição da ascorbato peroxidase cloroplasto (*APXCL*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão (n=3) ..... 89

**Figura 20** – Níveis de transcrição da catalase isoforma 1 (*CAT1*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão (n=3) ..... 90

**Figura 21** – Níveis de transcrição da catalase isoforma 2 (*CAT2*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão (n=3) ..... 90

**Figura 22** – Níveis de transcrição da cobre-zinco superóxido dismutase isoforma 1 (*CuZnSOD1*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão (n=3) ..... 91

**Figura 23** – Níveis de transcrição da cobre-zinco superóxido dismutase isoforma 2 (*CuZnSOD2*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -$

	3,8 a -3,9 MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação; $\Psi_w = -1,3$ a -1,9 MPa). Valores são apresentados por médias $\pm$ erro padrão (n=3).....	92
<b>Figura 24</b>	– Níveis de transcrição da cobre-zinco superóxido dismutase cloroplasto ( <i>CuZnSODCL</i> ) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_w = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_w = -2,3$ a -2,5 MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_w = -3,8$ a -3,9 MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação; $\Psi_w = -1,3$ a -1,9 MPa). Valores são apresentados por médias $\pm$ erro padrão (n=3).....	93
<b>Figura 25</b>	– Níveis de transcrição da ferro superóxido dismutase ( <i>FeSOD</i> ) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_w = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_w = -2,3$ a -2,5 MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_w = -3,8$ a -3,9 MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação; $\Psi_w = -1,3$ a -1,9 MPa). Valores são apresentados por médias $\pm$ erro padrão (n=3).....	93
<b>Figura 26</b>	– Níveis de transcrição da manganês superóxido dismutase ( <i>MnSOD</i> ) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_w = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_w = -2,3$ a -2,5 MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_w = -3,8$ a -3,9 MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação; $\Psi_w = -1,3$ a -1,9 MPa). Valores são apresentados por médias $\pm$ erro padrão (n=3).....	94
<b>Figura 27</b>	– Níveis de transcrição da glutaciona redutase citosólica ( <i>GRcit</i> ) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_w = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_w = -2,3$ a -2,5 MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_w = -3,8$ a -3,9 MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação; $\Psi_w = -1,3$ a -1,9 MPa). Valores são apresentados por médias $\pm$ erro padrão (n=3).....	95
<b>Figura 28</b>	– Níveis de transcrição da glutaciona redutase cloroplasto ( <i>GRCL</i> ) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_w = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_w = -2,3$ a -2,5 MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_w = -3,8$ a -3,9 MPa), REC	

(Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa).  
 Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão (n=3) ..... 96

**Figura 29** – Esquema demonstrando as expressões relativas ao calibrador (planta não transformada em condições normais de irrigação) obtidas dos genes *APX*, *SOD*, *CAT*, *GR*, suas isoformas e o gene *P5CS* nativo e transgene *P5CSF129A* em seus respectivos compartimentos celulares. O calibrador do gene *P5CSF129A* foi a condição normal de plantas transgênicas. A proporção das expressões está representada pelo tamanho das letras..... 105

## ANEXOS

**Figura 1** – Curva de dissociação do gene Actina (*ACT*)..... 131

**Figura 2** – Curva de dissociação do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*)..... 131

**Figura 3** – Curva de dissociação do gene  $\beta$ -tubulina ( *$\beta$ -TUB*)..... 132

**Figura 4** – Curva de dissociação do gene catepsina (*CtP*) ..... 132

**Figura 5** – Curva de dissociação do gene ciclofilina (*CYP*)..... 133

**Figura 6** – Curva de dissociação do gene ADP – fator de ribosilação (*ADP*) ..... 133

**Figura 7** – Curva de dissociação do gene ascorbato peroxidase isoforma 1 (*APX1*)..... 134

**Figura 8** – Curva de dissociação do gene ascorbato peroxidase isoforma 2 (*APX2*)..... 134

**Figura 9** – Curva de dissociação do gene ascorbato peroxidase cloroplasto (*APXCL*)..... 135

**Figura 10** – Curva de dissociação do gene catalase 1 (*CAT1*) ..... 135

**Figura 11** – Curva de dissociação do gene catalase isoforma 2 (*CAT2*)..... 136

**Figura 12** – Curva de dissociação do gene CuZn superóxido dismutase isoforma 1 (*CuZnSOD1*)..... 136

**Figura 13** – Curva de dissociação do gene CuZn superóxido dismutase isoforma 2 (*CuZnSOD2*)..... 137

<b>Figura 14</b> – Curva de dissociação do gene CuZn superóxido dismutase isoforma cloroplasto ( <i>CuZnSODCL</i> ).....	137
<b>Figura 15</b> – Curva de dissociação do gene Fe superóxido dismutase ( <i>FeSOD</i> ).....	138
<b>Figura 16</b> – Curva de dissociação do gene Mn superóxido dismutase ( <i>MnSOD</i> ).....	138
<b>Figura 17</b> – Curva de dissociação do gene glutationa redutase citosólica ( <i>GR</i> ).....	139
<b>Figura 18</b> – Curva de dissociação do gene glutationa redutase cloroplasto ( <i>GRCL</i> ).....	139
<b>Figura 19</b> – Curva de dissociação do gene P5CS nativo ( <i>CsP5CS</i> ).....	140
<b>Figura 20</b> – Curva de dissociação do gene P5CS transgene ( <i>P5CSF129A</i> ).....	140
<b>Figura 21</b> – Curva de dissociação do gene fator de alongamento 1 $\alpha$ ( <i>EF1<math>\alpha</math></i> ).....	141

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	24
3.1	ASPECTOS ECONÔMICOS DA CITRICULTURA .....	24
3.2	DÉFICIT HÍDRICO E SUAS CONSEQÜÊNCIAS PARA A CITRICULTURA .....	26
3.3	PORTA-ENXERTOS .....	27
3.4	REGULAÇÃO DA RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO .....	29
3.5	FISIOLOGIA DA PLANTA EM CONDIÇÕES DE SECA.....	30
3.6	PROLINA.....	32
3.7	DÉFICIT HÍDRICO E O ESTRESSE OXIDATIVO .....	36
3.7.1	Superóxido Dismutase .....	40
3.7.2	Ascorbato Peroxidase .....	42
3.7.3	Catalase .....	43
3.7.4	Glutationa Redutase .....	44
3.8	PROLINA E O ESTRESSE OXIDATIVO .....	45
3.9	PCR EM TEMPO REAL E GENES NORMALIZADORES .....	47
<b>4</b>	<b>ARTIGO A – Seleção de genes normalizadores para PCR em Tempo Real em citrumeleiro sob condição de deficiência hídrica</b> .....	51
4.1	INTRODUÇÃO.....	52
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	54
4.2.1	Material Vegetal .....	54
4.2.2	Condições de Déficit Hídrico.....	54
4.2.3	Parâmetros de Coleta .....	55
4.2.4	Seleção de Genes de Referência e Desenho de Primers .....	56
4.2.5	Extração de RNA .....	58
4.2.6	Teste de Eficiência de Primers .....	59
4.2.7	PCR em Tempo Real .....	60
4.2.8	Análise dos Dados .....	60
4.3	RESULTADOS .....	61

4.4	DISCUSSÃO.....	62
<b>5</b>	<b>ARTIGO B – Expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes em citrumeleiro ‘Swingle’ com alto acúmulo de prolina submetido ao déficit hídrico.....</b>	<b>68</b>
5.1	INTRODUÇÃO.....	69
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	73
5.2.1	Material Vegetal .....	73
5.2.2	Condições de Déficit Hídrico.....	73
5.2.3	Parâmetros de Coleta .....	74
5.2.4	Quantificação de Prolina .....	74
5.2.5	Determinação do Conteúdo de Malondialdeído (MDA) .....	75
5.2.6	Busca e Análise de Seqüências ESTs de Enzimas Antioxidantes e Desenho de Primers .....	76
5.2.7	Extração de RNA .....	78
5.2.8	Teste de Eficiência de Primers .....	79
5.2.9	PCR em Tempo Real.....	80
5.3	RESULTADOS .....	80
5.3.1	Dendrogramas de Similaridade.....	80
5.3.2	Quantificação de Prolina .....	83
5.3.3	Conteúdo de Malondialdeído (MDA)89	
	5.3.4 PCR em Tempo Real.....	84
5.3.4	PCR em Tempo Real .....	85
5.3.4.1	<i>P5CS</i> Nativo e o transgene <i>P5CSF129A</i> .....	85
5.3.4.2	Ascorbato peroxidase .....	87
5.3.4.3	Catalase.....	89
5.3.4.4	Superóxido dismutase .....	91
5.3.4.5	Glutathiona redutase.....	94
5.4	DISCUSSÃO.....	96
	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>107</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>108</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>129</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas cítricas são as fruteiras mais cultivadas no mundo (FNP, 2006). O agronegócio de citros, juntamente com o da cana-de-açúcar, celulose e de grãos vem se mantendo como um dos mais competitivos, com melhor remuneração do produtor por hectare cultivado e, proporcionalmente aos demais, com maior empregabilidade por área cultivada. A citricultura brasileira apresenta números expressivos que traduzem a grande importância econômica e social que a atividade tem para a economia do país.

A cadeia produtiva de citros movimentava cerca de R\$ 9 bilhões por ano, gerando direta e indiretamente cerca de 400.000 empregos. Em 2006 o Brasil exportou US\$ 1,47 bilhão em suco de laranja, o que representa uma fatia de 82% do mercado mundial. Segundo dados de 2007 do USDA, cerca de 40% da produção mundial de laranja e 60% do suco concentrado concentram-se no Brasil, o que enfatiza a importância desta agroindústria para o Brasil.

A citricultura é freqüentemente exposta a climas secos, já que é uma cultura perene de longo período produtivo. A maioria das regiões produtoras de citros apresenta um volume adequado de chuvas para a cultura, entretanto, o mais importante é a distribuição pluviométrica. De acordo com Doorenbos e Kassan (1979) e Cunha e Bergamaschi (1992), períodos com precipitação inferior a 50-60 mm são considerados períodos de déficit hídrico. Chuvas abaixo do normal de maio a agosto no Paraná, São Paulo e Nordeste são freqüentes, afetando negativamente a cultura. Em anos com distribuição irregular de chuvas, podem ocorrer perdas de 20% (ORTOLANI et al., 1991). Além de afetar a produtividade e aumentar os custos envolvidos no processamento de suco (IEA, 2000), déficits hídricos podem também agravar os sintomas de certas doenças, podendo inclusive causar a morte de plantas doentes (ABECITRUS, 2007).

Condições de seca, alta salinidade e baixas temperaturas são estresses ambientais que causam efeitos adversos no crescimento e produtividade de diversas culturas. Plantas têm desenvolvido respostas de adaptação a estes estresses a níveis celulares, moleculares, fisiológicos e bioquímicos possibilitando então a sua sobrevivência (Yamaguchi-Shinozaki; Shinozaki, 2006). A expressão de uma variedade de genes é induzida por essas contrariedades ambientais em várias

plantas (Yamaguchi-Shinozaki; Shinozaki, 2000) e os produtos destes genes não somente agem na tolerância ao estresse como também regulam a expressão gênica e transdução de sinais (XIONG et al., 2002; SHINOZAKI et al., 2003; BARTELS; SUNKAR, 2005).

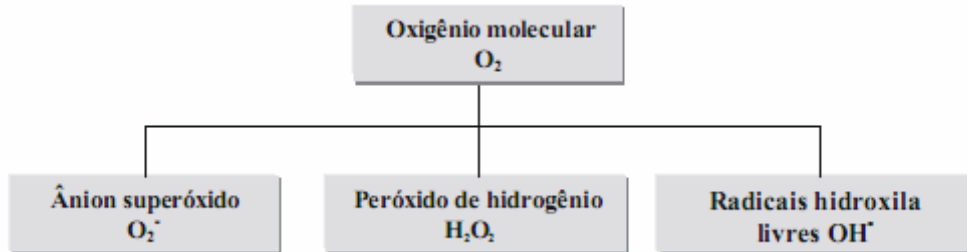
Alguns produtos destes genes são proteínas que atuam em sistemas de proteção das células contra a desidratação, tais como as enzimas envolvidas na biossíntese de vários osmoprotetores como a prolina (BORNERT; JENSEN, 1996; BRAY, 1997; ZHU ET AL., 1998). Os níveis de moléculas osmoprotetoras geralmente aumentam durante os estresses abióticos. O aminoácido prolina é um dos componentes orgânicos que pode funcionar como soluto compatível, moléculas que podem ser acumuladas em concentrações tão altas que não interrompem a atividade celular. Solutos compatíveis permitem que as plantas baixem o seu potencial de água e mantenham turgor durante seca ou salinidade (BUCHANAN et al, 2000).

Além disso, a prolina pode atuar na estabilização de estruturas celulares e na remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que afetam seriamente o metabolismo de plantas através da oxidação de membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos (SMIRNOFF, 1993; GÓMEZ et al., 1999; HERNÁNDEZ et al., 2001).

Também, neste primeiro grupo encontram-se as enzimas antioxidantes envolvidas na defesa contra espécies reativas de oxigênio (ROS) Condições ambientais adversas como variações de temperatura, alta luminosidade, exposição a herbicidas, salinidade, presença de patógenos e déficit hídrico (MITTLER, 2006), podem levar à formação de espécies reativas de oxigênio que normalmente são controlados por sistemas de defesa antioxidante (APEL; HIRT, 2004).

O oxigênio molecular ( $O_2$ ) é relativamente não reativo e não tóxico, devido a estrutura estável dos elétrons na sua camada externa. Entretanto, alterações na distribuição dos elétrons podem provocar a sua ativação e influenciar os sistemas biológicos. As ROS podem ser geradas dentro das plantas como resultado da excitação de um elétron externo, formando oxigênio simples ( $^1O_2$ ) ou de uma sucessiva adição de elétrons ao oxigênio molecular produzindo  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$

e  $\text{OH}^\cdot$  (Figura 1). Essas moléculas são consideradas “ativas” porque não necessitam da entrada de energia para reagir com outras moléculas (RESENDE et al., 2003).



**Figura 1** – Formação de radicais livres a partir de oxigênio molecular.

Dentre os sistemas de remoção de ROS, estão as enzimas antioxidantes como as superóxido dismutases, catalases, ascorbato peroxidases e glutathiona redutases. Contudo, um acúmulo acelerado das espécies reativas pode levar a planta ao estresse oxidativo devido a uma queda na atividade antioxidante devido ao esgotamento destes antioxidantes (SCANDALIOS, 2005).

A capacidade de proteção celular conferida através da prolina está relacionada às suas propriedades químicas. Além da formação de radicais mais estáveis através da reação com radicais  $\text{OH}^\cdot$  (SMIRNOFF; CUMBES, 1989), o anel pirrolidina presente em sua estrutura apresenta baixa capacidade de fornecer elétrons, o que confere ao aminoácido a capacidade de formar complexos de transferência de carga, removendo  $^1\text{O}_2$  com eficiência (AUE et al., 1976).

A introdução do gene mutante *P5CS* de *Vigna acotifolia*, que codifica a enzima-chave para a biossíntese da prolina  $\Delta$ 1-pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS), controlado por promotor constitutivo 35S CaMV em plantas de citros aumentou a tolerância ao déficit hídrico (MOLINARI et al., 2004). Foi observado nesse trabalho que o alto acúmulo do aminoácido conferiu às plantas transgênicas tolerância a períodos prolongados de deficiência hídrica devido à ocorrência de ajustamento osmótico. Porém, nenhuma relação do efeito da prolina com a diminuição do estresse oxidativo causado pelo déficit hídrico foi avaliada nesse experimento. Alguns trabalhos têm mostrado uma relação direta e positiva entre o aumento da atividade de enzimas ligadas à defesa contra o estresse oxidativo e o nível de prolina (TSUGANE et al., 1999; HONG et al., 2000; OKUMA et

al., 2000, 2002). Entretanto, estes trabalhos utilizam altas concentrações de prolina exógena, as quais não são encontradas em condições normais em tecidos vegetais, submetidos ou não a estresses abióticos.

Em plantas de *Arabidopsis* a aplicação exógena de prolina causou danos em estruturas celulares como cloroplastos e mitocôndrias. Estes danos foram atribuídos à inibição do feedback da biossíntese de prolina, causando reduções consideráveis nos pools de aceptores de elétrons fotossintéticos (HARE et al., 2000). Vários outros trabalhos já relataram altas concentrações de prolina exógena como sendo tóxica em plantas podendo até levar à morte celular (HELLMAN et al., 2000; DEUSCHLE et al., 2001; MANI et al., 2002; AYLIFFE et al., 2002; DEUSCHLE et al., 2004). Verbruggen e Hermans (2008) verificaram que aplicações exógenas de prolina maiores que 10mM são tóxicas para plantas de *Arabidopsis*.

Como os estudos existentes até o momento têm focado mais o efeito da prolina sobre a atividade de enzimas antioxidantes, a realização deste trabalho buscou prover informações referentes à alteração do perfil transcricional de genes codificando diferentes isoformas das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em plantas de citrumeleiro Swingle com alto acúmulo de prolina endógena. Desta forma, este trabalho objetivou verificar o efeito da alta concentração intracelular de prolina per se na expressão dos genes que codificam estas enzimas antioxidantes pela análise das plantas em condições normais de suprimento de água, como também avaliou as modificações nos níveis transcricionais desses genes em plantas submetidas ao déficit hídrico.

## 2 OBJETIVOS

Tendo em vista a falta de estudos sobre o efeito do aumento da concentração de prolina endógena na expressão dos genes que codificam enzimas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo que ocorre em condições de déficit hídrico, este trabalho teve por objetivo:

- Selecionar genes normalizadores adequados para as avaliações de atividade de transcricional por PCR em Tempo Real de plantas de citrumeleiro submetidas ao déficit hídrico
- Verificar o efeito do elevado acúmulo intracelular de prolina nos níveis transcricionais de genes de enzimas antioxidantes envolvidas na proteção contra espécies reativas de oxigênio (ROS) em plantas de citrumeleiro, tanto em condições normais de suprimento de água como em diferentes níveis de déficit hídrico.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ASPECTOS ECONÔMICOS DA CITRICULTURA

O Brasil ocupa atual posição de maior produtor mundial de laranja (FAO, 2005). Somente na safra 2007/2008 o Brasil exportou cerca de 1 milhão de toneladas de suco concentrado de laranja e 50 mil do produto *in natura* (SECEX, 2008).

As exportações brasileiras de suco de laranja superaram R\$2 bilhões pela primeira vez na história, na safra 2006/07. O faturamento da indústria processadora com as vendas externas totais atingiu US\$ 2,01 bilhão na safra passada, alta de 64,78% sobre o US\$ 1,22 bilhão movimentado na safra 2005/2006, de acordo com dados da Secretaria de Comércio Exterior (SECEX) do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio. Se consideradas apenas as exportações de suco de laranja concentrado e congelado, o faturamento da indústria cresceu 70,75% na safra 2006, em comparação com a anterior (ABECITRUS, 2007).

Em função da estiagem prolongada no parque citrícola no segundo semestre de 2007, a produção da safra atual (2008/09) ficou cerca de 15% abaixo do potencial produtivo (360/370 milhões de caixas de 40,8 kg), estimada em 310 milhões de caixas por agentes do mercado. Na temporada anterior (2007/08), foram colhidas 367 milhões de caixas (CEPEA, 2009).

O perfil da citricultura brasileira mudou na última década. Além da migração do cultivo para o sudoeste de São Paulo, maior produtor brasileiro, as regiões Sul e Nordeste têm cada vez maior participação na produção brasileira de laranja. São Paulo é o principal produtor nacional de laranja e possui o maior pomar do mundo, com 691,26 mil hectares e cerca de 200 milhões de pés. A produção alcançou 368,2 milhões de caixas de 40,8 quilos em 2007 (GCONCI, 2008). Por meio de transferência de tecnologia da indústria processadora de suco de laranja de São Paulo, cerca de 8% ou 100 mil toneladas exportadas da bebida são de outros Estados, o que fomenta o desenvolvimento dos novos pólos regionais.

O Estado de São Paulo responde por mais de 70% de toda a laranja produzida no país e 98% da produção de suco. O Estado responde ainda por 99%

das exportações de laranja in natura e de 95% das exportações de suco de laranja. A produção nos outros estados está entre 70 e 90 milhões de caixas, das quais 10% são destinados à produção de suco para exportação e 90% para o mercado interno de fruta fresca e de suco para empresas especializadas no mercado doméstico, que vem apresentando expressivo crescimento nos últimos anos. Os principais estados produtores, depois de São Paulo, são: Sergipe, Paraná, Rio Grande do Sul, Bahia, Minas Gerais e Santa Catarina (Abecitrus, 2008).

Segundo dados do levantamento de campo feito pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (Cati), da Secretaria Estadual de Agricultura e Abastecimento, cerca de 95% dos citricultores de São Paulo são pequenos produtores, com pomares, em média, de 34,3 hectares, aonde são cultivadas 11,6 mil plantas. Segundo o Instituto de Economia Agrícola (IEA-Apta), o levantamento indica que 12,1% da área e 11,9% das plantas são irrigadas em propriedades com citros em São Paulo e que a produtividade nessas áreas é de 90 quilos (ou 2,2 caixas de 40,8 quilos) por pé. Já em áreas sem irrigação, a produtividade é de 80 quilos ou 1,96 caixa por pé (JOHN DEERE, 2008).

De acordo com a Abecitrus (2007), entre os triênios 1995/1997 e 2005/2007, a área de laranja em Sergipe cresceu 26,6% e a produção, hoje em 18,3 milhões de caixas, aumentou 15,1%. Na Bahia, a produção estimada em 21 milhões de caixas por safra, saltou 29,6% em igual período (IBGE, 2007). Em 2000, 55% da produção de laranja concentrava-se no Norte e 45% no Sul paulista. Em 2010 a expectativa é que essa ordem seja de 38% para 62%.

A citricultura no estado do Paraná ganhou dimensão econômica a partir do fim da década de 80, quando o governo paranaense rompeu com o lobby paulista e estimulou a produção de citros vinculada à industrialização (CASADO, 2004). Em 2006 foram cultivados 28,4 mil hectares de citros, incluindo laranjas, tangerinas e limões, proporcionando a colheita de 619,1 mil toneladas e gerando o valor bruto da produção de R\$170 milhões. Atualmente o Paraná conta com três indústrias que produzem suco de laranja, duas do sistema cooperativo Cocamar e Corol e uma de capital privado formada por citricultores, a Citri. Para suco industrial estão destinados 30 mil hectares e área colhida de 19, mil hectares que produziram 11,4 milhões de caixas de 40,8kg (SEAB, 2008).

Os produtores da região norte do Paraná obtiveram produção recorde de laranja em 2008/2009. Até o final de dezembro, 270 produtores de

laranja, associados da Corol Cooperativa Agroindustrial de 43 municípios, colheram mais de 2,5 milhões de caixas da fruta. Na indústria de transformação, elas foram convertidas em aproximadamente 9 mil toneladas de suco concentrado, que é comercializado com a Europa, Israel e Chile (GCONCI, 2009).

### 3.2 DÉFICIT HÍDRICO E SUAS CONSEQÜÊNCIAS PARA A CITRICULTURA

Entre os vários fatores limitantes da produção vegetal, o déficit hídrico ocupa posição de destaque, pois além de afetar as relações hídricas nas plantas, alterando-lhes o metabolismo, é fenômeno que ocorre em grandes extensões de áreas cultiváveis (NOGUEIRA et al., 2001).

Souza et al (2004) constataram que o estresse hídrico reduziu a produção de frutos das árvores, durante o período de sua aplicação, e aumentou nos meses subseqüentes ao estresse.

Ao definir estratégias para reduzir riscos na citricultura, deve-se considerar que estiagens curtas são mais prováveis e possivelmente contornáveis pela combinação adequada de práticas de cultivo. Por outro lado, estiagens mais longas, embora menos freqüentes, são mais difíceis de contornar por simples práticas de manejo (CUNHA; BERGAMASCHI, 1992). Apesar da incidência de déficits temporários nas regiões citrícolas, o uso de irrigação é ainda pequeno no país, principalmente devido aos custos da implantação de sistemas de irrigação.

O requerimento hídrico para uma boa produção de citros é cerca de 900 a 1200 mm por ano e varia com a demanda evapotranspirométrica, solo, copa e principalmente com o porta-enxerto utilizado (DONATO, 2007).

A produção dos citros, desde sua implantação à colheita, é submetida a contínuos e variados estresses de natureza biótica e abiótica de diferentes intensidades (CRUZ, 2003). Nas áreas cultivadas com citros, no Brasil, é comum ocorrer deficiência hídrica no solo, associada a elevados déficits de pressão de vapor, aumentando as limitações à expressão da produtividade potencial (MEDINA, 1999).

De acordo com Assad (2008), o aquecimento global pode beneficiar algumas culturas, mas por outro lado acarretará sérios problemas a outras. Com o

aumento da incidência de estresse hídrico uma das estratégias para contornar o problema é o desenvolvimento de plantas transgênicas que sejam resistentes à seca e a altas temperaturas.

Além de afetar a produtividade e a qualidade dos frutos, déficits hídricos também podem agravar sintomas de doenças, podendo inclusive causar a morte das plantas doentes. Isso é observado principalmente em doenças vasculares, como CVC (Clorose Variegada dos Citros) (MEDINA, 2002; MACHADO et al., 2007) e o Declínio dos Citros (BERGUER, 1998).

### 3.3 PORTA-ENXERTOS

Os porta-enxertos são de grande importância na citricultura, uma vez que estes e o comportamento da copa estão diretamente relacionados. Dentre as diversas características da planta que são influenciadas pelos porta-enxertos, as principais são a produtividade (WUTSCHER; BISTLINE, 1988; POMPEU Jr., 1991), o desenvolvimento vegetativo (TEÓFILO SOBRINHO, 1991), a tolerância a doenças (GUIRADO et al., 1991), a qualidade interna e externa dos frutos (WARDOWSKI et al., 1986), as relações hídricas e trocas gasosas (SYVERTSEN; GRAHAM, 1985; YELENOSKY, 1991) e tolerância a estresses ambientais como salinidade e déficit hídrico (WUTSCHER; BISTLINE, 1988; POMPEU Jr., 1991; CERQUEIRA, 2004). Desta forma, o uso de porta-enxertos permite superar fatores abióticos e bióticos e obter ganhos de produtividade (POMPEU Jr, 2005).

O limão cravo passou a ser utilizado a partir de 1960 como único porta-enxerto na citricultura paulista devido às suas características de facilidade de formação das mudas, compatibilidade com todas as copas, produção precoce, altas produções de frutos de boa qualidade, e grande resistência à seca, além da tolerância à tristeza (POMPEU Jr, 2005). Ledo et al. (1999), ao avaliar o comportamento de diferentes cultivares de laranjeiras doces nos porta-enxertos limão 'Cravo', tangerinas 'Cleópatra' e 'Sunki' e citrange 'Carrizo', observou que em relação aos demais porta enxertos, o limão 'Cravo' mostrou tendências de induzir maior produção/ volume de copa e peso médio do fruto, e menor teor de sólidos solúveis totais e acidez total.

Atualmente o limão 'Cravo' é utilizado como porta-enxerto em 85% das árvores e seu cultivo é caracterizado pela não-irrigação, já que é tolerante à seca (FUNDECITRUS, 2004). Em segundo lugar estão as plantas enxertadas sobre citrumelo 'Swingle', com pouco mais de 10% e as demais estão basicamente sobre citrange 'Carrizo', limão 'Rugoso', tangerina 'Cleópatra' e laranja 'Caipira'.

No ano de 2001 foi identificada a morte súbita dos citros (MSC), uma doença de combinação copa/porta-enxerto que representa uma ameaça à citricultura brasileira por afetar todas as variedades de laranja doce enxertadas em limão 'Cravo'. Inicialmente as folhas perdem o brilho e caem, posteriormente ocorre a seca dos ramos e os frutos paralisam seu desenvolvimento. As plantas definham e morrem em período variável de semanas (BLUMER, 2005). Com isso, há uma tendência de substituir o porta-enxerto de limão 'Cravo' por outros como a 'Sunki', 'Cleópatra' e o 'citrumelo Swingle' (FUNDECITRUS, 2004).

Visando estudar o comportamento inicial de plantas de tangerinas enxertadas sobre citrange 'Troyer' (*Citrus sinensis* (L) Osb. x *P. trifoliata*), citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* Macf. x *P. trifoliata*) e *P. trifoliata*, Schafer et al. (2001) observaram que o citrumelo 'Swingle' foi o porta-enxerto que apresentou melhor resultado, aumentando a eficiência produtiva da tangerina 'Montenegrina'. Entretanto, mesmo sendo tolerante a doenças como a morte súbita do citros e declínio do citros, os porta-enxertos alternativos ao limoeiro cravo, como o citrumelo 'Swingle', apresentam ainda uma importante desvantagem: são mais suscetíveis ao estresse hídrico (STUCHI et al., 2004).

As diferentes combinações de porta-enxerto e copa, por revelarem comportamentos característicos em relação às trocas gasosas e hídricas, afetam o grau de tolerância à seca, uma vez que o comportamento fisiológico da parte aérea pode ser afetado pelo genótipo do porta-enxerto (IACONO et al., 1998). A influência dos porta-enxertos sobre a copa pode ocorrer por mudanças no balanço hormonal, na absorção de água e no potencial hídrico foliar (CANDOLFI-VASCONCELOS et al., 1994). Sob deficiência hídrica, a interação entre porta-enxerto e copa pode se tornar mais significativa. As diferenças na capacidade do sistema radicular dos porta-enxertos em absorver água pode ser responsável pelas variações no grau de tolerância à seca da cultivar copa (CARBONNEAU, 1985).

### 3.4 REGULAÇÃO DA RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO

As plantas, quando submetidas à seca, apresentam acentuada redução da biomassa de raízes, caules, folhas, flores e frutos (MAHAJAN; TUJETA, 2005). Os primeiros sinais visíveis da deficiência hídrica ocorrem nas folhas, que apresentam senescência prematura; no entanto, as mudanças morfológicas e metabólicas iniciais acontecem nas raízes. Essas mudanças não refletem meramente na redução progressiva do conteúdo de água na planta, mas também em mudanças qualitativas e quantitativas em seu metabolismo, sugerindo que através de um grande número de mecanismos, as plantas podem, dentro de diferentes limites, tolerarem a seca e se recuperar de seus efeitos (KAVAR et al., 2008).

A seca causa quedas das taxas de fotossíntese nos citros, primariamente por induzir a queda no potencial da água e a perda de turgescência foliar, causando o fechamento estomático e dificultando o acesso de CO<sub>2</sub> ao mesófilo (MEDINA; MACHADO, 1998). Assim, a redução da perda de água por transpiração é considerado um mecanismo de escape à deficiência hídrica.

Em plantas submetidas a estresses abióticos, verifica-se que as alterações acontecem tanto em nível pós-transcricional quanto pós traducionais (MAZZUCOTELLI et al., 2008). Entretanto, a regulação durante a transcrição é a principal via, onde ocorre a atuação dos fatores de transcrição (ROOK et al., 2006). Estes fatores de transcrição são reguladores críticos nas mudanças da expressão gênica, conduzindo processos de desenvolvimento e respostas a estresses ambientais.

As respostas envolvidas em estresses ambientais estão relacionadas a uma complexa rede de sinalização metabólica que controla a percepção dos sinais, a geração de mensageiros secundários e de sinais de transdução (SHAO et al., 2007). Genes estresse-induzidos parecem proteger as células contra o déficit hídrico não somente pela síntese de proteínas e metabólitos importantes, como também pela regulação de genes para transdução de sinais na resposta ao estresse (INGRAM; BARTELS, 1996; BRAY, 1997). Os produtos desses genes podem ser classificados em três grupos: (1) proteínas que protegem diretamente as células das plantas, como chaperonas, proteínas LEA,

osmoprotetores, proteínas anti-congelamento, enzimas detoxificadoras e as que capturam radicais livres (BRAY et al., 2000);

(2) aquelas envolvidas na sinalização de cascatas e controle transcricional (Jung et al, 2008) como as MAP-quinases (MAPKs), proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs) (LUDWIG et al., 2004), SOS quinase (ZHU, 2001), fosfolipases (FRANK et al., 2000) e fatores de transcrição (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000); e (3) proteínas envolvidas na captação e transporte de água e íons, como as aquaporinas e transportadores iônicos (BLUMWALD, 2000).

Genes induzidos por desidratação, na maioria dos casos, são induzidos por ABA (GIRAUDAT et al., 1994). Entretanto, estudos descreveram genes cuja expressão é induzida pela desidratação, mas não respondem a tratamentos com ABA exógeno (INGRAM; BARTELS, 1996; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997). Análises moleculares têm demonstrado a existência de sistemas regulatórios dependentes e não dependentes de ABA na rede regulatória transcricional sob condições de seca (SEKI et al., 2007).

Desta forma, para garantir a sobrevivência, o metabolismo da planta sob condição de estresse pode ser alterado, sendo que o ajustamento osmótico é um dos mais freqüentes mecanismos utilizados pela planta permitindo que ela continue a absorver água mesmo com potenciais hídricos mais baixos no solo favorecendo a manutenção da turgescência celular (HARE, 1998). Dentre os vários reguladores osmóticos, a prolina ocupa lugar de destaque (HASEGAWA et al., 2000).

### 3.5 FISIOLOGIA DA PLANTA EM CONDIÇÕES DE SECA

Baixa disponibilidade de água no solo acarreta desidratação, redução do crescimento e aceleração da senescência dos tecidos da planta, comprometendo o crescimento por reduzir as taxas de expansão foliar, de fotossíntese e de aparecimento de lâminas foliares (BENETT;SULIVAN, 1981).

O nível de tolerância ao estresse hídrico varia com as espécies. Plantas de metabolismo C4 e C3 perdem por transpiração, em média, 250 e 500 moléculas de água por molécula de CO<sub>2</sub> fixada, respectivamente, o que torna as

plantas C4, de um modo geral, mais eficientes no uso da água e melhor adaptadas às condições de deficiência hídrica (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O estresse hídrico reduz o crescimento da planta por retardar a taxa de divisão e expansão foliar principalmente devido à perda de turgor. O conteúdo relativo de água, o potencial hídrico e seus componentes (potencial de pressão e osmótico), são os parâmetros mais comumente utilizados para indicar o estado de água na planta (KIANI, 2007). A manutenção do turgor por meio de aumento na concentração de solutos, ajustamento osmótico, é o principal mecanismo para manter a atividade fisiológica quando o potencial hídrico diminui (OBER et al., 2005).

O ajustamento osmótico ocorre através do acúmulo de solutos compatíveis na célula. Estes osmoprotetores não interferem no metabolismo celular mesmo quando presentes em grandes concentrações e contribuem para a redução do potencial osmótico. Aminoácidos como prolina, compostos quaternários e outras aminas, como glicinabetaína e poliaminas, e uma variedade de açúcares e álcoois de açúcar, como manitol, trealose, galactinol e rafinose, estão entre os principais solutos compatíveis acumulados durante o estresse (MAHAJAN; TUTEJA, 2005).

Tezara et al. (2002) verificou que os parâmetros de troca gasosa, transpiração e fotossíntese de girassol, reguladas por condutância estomática, diminuiriam em condições de seca. Os estômatos são sensíveis a alterações no estado de água nas folhas, sendo que estes se fecham quando o potencial hídrico diminui (KIANI, 2007). Além disso, estresse hídrico pode também limitar a fotossíntese por prejudicar a fixação de CO<sub>2</sub>, levando a um aumento na concentração intracelular de CO<sub>2</sub> (FLEXAS; MEDRANO, 2002).

Em condições de estresse hídrico moderado, a taxa fotossintética da folha raramente é tão responsiva quanto a expansão foliar, pois a fotossíntese é muito menos sensível ao turgor. Como os estômatos fecham durante os estádios iniciais do estresse hídrico, a eficiência do uso da água pode aumentar, ou seja, mais CO<sub>2</sub> pode ser absorvido por unidade de água transpirada, porque o fechamento estomático inibe a transpiração mais do que diminui as concentrações intracelulares de CO<sub>2</sub>. Com estresse severo, a fotossíntese é inibida, o metabolismo do mesófilo é prejudicado e a eficiência do uso de água decresce (TAIZ; ZEIGER, 2004).

### 3.6 PROLINA

As plantas têm demonstrado vários mecanismos de proteção que lhes permitem manter um crescimento contínuo em condições desfavoráveis (SAWAHEL; HASSAN, 2002). Um destes mecanismos é o acúmulo de certos metabólitos orgânicos de baixo peso molecular que são conhecidos como solutos compatíveis (SAKAMOTO; MURATA, 2000). O papel fundamental destes metabólitos é o de servir como osmólitos orgânicos com propriedades compatíveis em altas concentrações que aumentam a capacidade das células vegetais em reter água sem alterar as funções normais da célula, agindo então como osmoprotetores (Sawahel; Hassan, 2002). Foi proposto que a prolina pode atuar como chaperonas moleculares estabilizando a estrutura de proteínas, e a sua acumulação pode prover uma regulação de pH citosólico e balancear o status redox da célula. Além disso, este aminoácido também parece estar envolvido na sinalização do estresse influenciando as respostas adaptativas (MAGGIO et al., 2002).

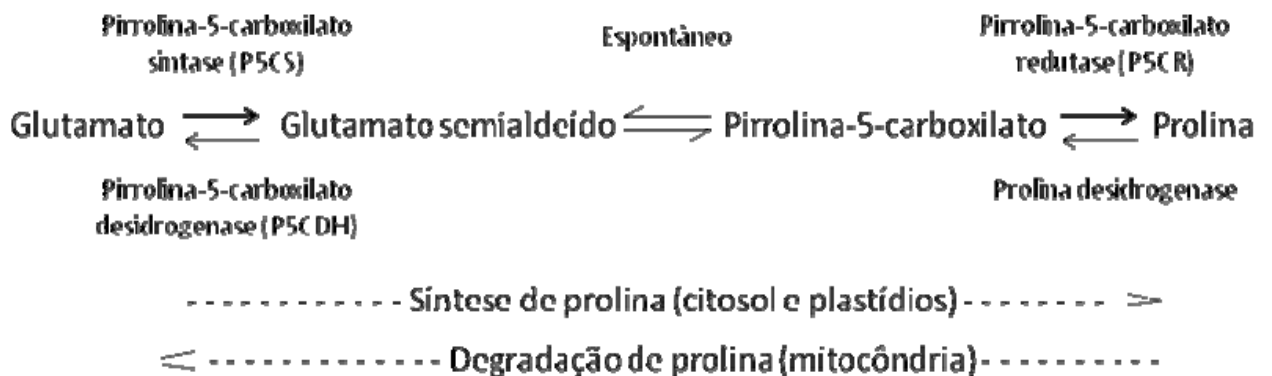
A prolina desempenha importante papel em plantas submetidas a estresses, como seca e salinidade (DELAUNEY AND VERMA, 1993) sendo que sua síntese, acumulação e catabolismo são processos altamente regulados (HONG, 2000). Sob condições de estresse, a prolina atua como mediador do ajustamento osmótico (HANDA et al., 1986), estabilizador de estruturas sub-celulares (SCHOBERT; TSCHESCHE, 1978), removedor de radicais livres (SARADHI et al., 1995; SMIRNOFF; CUMBES, 1989), depósito de energia (SARADHI; SARADHI, 1991), componente da cascata de sinalização molecular do estresse (WERNER; FINKELSTEIN, 1995) e como constituinte principal de proteínas da parede celular de plantas (NANJO et al., 1999).

Também, uma quebra rápida de prolina é uma forma de aliviar o estresse por prover agentes redutores suficientes que apóiam a fosforilação oxidativa mitocondrial e geração de ATP para que a planta se recupere do estresse e repare os danos acumulados (HARE et al., 1998).

A prolina em plantas constitui menos que 5% dos aminoácidos totais livres em condições normais, mas sob várias formas de estresse a sua concentração pode chegar a 80% do "pool" total de aminoácidos (ALIA, 2003). O acúmulo de

prolina em resposta ao estresse salino ou hídrico em plantas é primariamente localizado no citosol (KETCHUM et al., 1991; PAHLICH et al., 1993).

Em plantas superiores, a prolina é sintetizada via ácido glutâmico (glutamato) e ornitina (Figura 2). A primeira é considerada a maior e principal via, especialmente sob estresse osmótico (DELAUNEY; VERMA, 1993; DELAUNEY et al., 1993; KAVI KISHOR et al., 1995). A prolina é sintetizada a partir do glutamato via  $\Delta^1$  - pirrolina - 5 - carboxilato (P5C), por duas reações sucessivas catalisadas pelas enzimas P5C sintetase (P5CS), no primeiro passo, e P5C redutase (P5CR) no passo final (Figura 2). A partir de ornitina, a prolina pode ser sintetizada por duas rotas, ambas envolvendo a transaminação da ornitina, seguida pela sua ciclização e redução (DELAUNEY; VERMA, 1993). O produto da transaminação do grupo  $\alpha$  - amino da ornitina é o  $\alpha$  - ceto -  $\delta$  - aminovalerato que cicla para  $\Delta^1$  - pirrolina - 2 - carboxilato (P2C), que é reduzido à prolina. Alternativamente, a transaminação do grupo  $\delta$  - amino produz GSA (glutamato semi-aldeído) que é convertido a prolina via P5C.



**Figura 2** – Via de síntese e degradação de prolina em plantas

A P5CS é a enzima limitante para a biossíntese da prolina e é inibida pelo mecanismo de *feedback* a partir do acúmulo deste aminoácido (ZHANG et al., 1995). Estudos anteriores mostram que o acúmulo de prolina em plantas submetidas a estresse está envolvido com a perda da regulação por *feedback* devido a uma alteração conformacional da proteína P5CS (BOGGESS et al., 1976A, 1976B).

Pela utilização da mutação “sítio-dirigida”, o aminoácido fenilalanina na posição 129 foi substituído por alanina na enzima P5CS de *Vigna aconitifolia*. Esta enzima mutante (P5CSF129A) apresenta as mesmas características da P5CS nativa, porém com o mecanismo de *feedback* praticamente eliminado (ZHANG et al., 1995), acumulando uma quantidade maior de prolina nos tecidos. Hong et al. (2000) verificaram que plantas de tabaco contendo o gene mutante de P5CS acumulam mais prolina, produzem menos radicais livres e se apresentaram mais tolerantes a estresse osmótico do que plantas que continham somente o transgene selvagem.

Molinari et al. (2004) obtiveram plantas dos porta-enxertos citrange Carrizo e citrumelo Swingle contendo o gene *P5CS* mutante, sob controle de promotor constitutivo 35SCaMV, visando maior acumulação de prolina. As plantas apresentaram ajustamento osmótico em solos secos e sobreviveram a um período maior de condições severas de estresse hídrico. Apesar deste e vários outros trabalhos terem indicado uma correlação positiva entre o acúmulo da prolina e a tolerância ao estresse osmótico em plantas (HANDA et al., 1986; KAVI KISHOR et al., 1995; VAN RENSBURG et al., 1993), outros têm proposto que um aumento no nível da prolina livre é simplesmente um resultado do estresse (DELAUNEY; VERMA, 1993; HARE; CRESS, 1997; MADAN et al., 1995). Desta forma, os papéis da prolina na tolerância ao estresse são ainda controversos.

Em plantas de arroz crescidas em condições de estresse salino, o acúmulo de prolina em folhas foi considerado um sintoma de injúria do sal do que uma indicação de tolerância ao sal (LUTTS et al., 1999). Similarmente, avaliações do acúmulo e distribuição de prolina durante o desenvolvimento de folhas e brotos em dois genótipos de sorgo, suscetível e tolerante ao estresse salino, sugeriram que o acúmulo de prolina foi uma reação ao estresse e não uma resposta associada com tolerância (de LACERDA et al., 2003).

Schafleitner e colaboradores (2007) analisaram clones de batata suscetíveis e resistentes ao estresse hídrico com relação à expressão gênica de genes envolvidos na biossíntese e catabolismo de prolina. Na maioria dos clones a correlação entre os genes *P5CS* e prolina desidrogenase (*ProDH*) em condições de estresse moderado foi negativa. Foi observada alta repressão da prolina desidrogenase nos clones onde *P5CS* era fortemente induzido. Quando as plantas eram submetidas a uma seca prolongada essa correlação desaparecia. Não foi observada correspondência entre a concentração de prolina livre e a expressão dos

genes P5CS ou prolina desidrogenase sugerindo que a regulação provavelmente seja pós transcricional.

Apesar das contradições sugeridas, existem mais evidências que suportam a teoria de uma correlação positiva entre o acúmulo do aminoácido prolina e a tolerância ao estresse (ASHRAF; FOOLAD, 2006). Plantas de tabaco super-expressando prolina reduziram significativamente os níveis de radicais livres tolerando 200mM de NaCl (HONG et al., 2000). Em *Arabidopsis*, plantas com cDNA antisenso de prolina desidrogenase apresentaram aumento na quantidade de prolina e tolerância a baixas temperaturas assim como salinidade (acima de 600mM de NaCl) (NANJO et al., 2003).

Dois genes de *P5CS* foram identificados em *Arabidopsis thaliana*. Durante o estresse a *P5CS1*, mas não a *P5CS2*, foi requerida para acúmulo de prolina (FABRO et al., 2004; SZÉKELY et al., 2008). Durante estresse salino e osmótico diferentes vias de sinalização são responsáveis pela regulação do gene *P5CS1*. A indução de expressão do gene *P5CS1* em *A. thaliana* depende da fosfolipase C em estresse salino mas não durante déficit hídrico (PARRE et al., 2007).

Recentemente, Székely et al. (2008) relatou a primeira evidência relacionada à especificidade do tipo celular e padrões de sublocalização das *P5CS1* e *P5CS2* em *Arabidopsis*. Este estudo evidenciou a não redundância de duas isoenzimas de P5CS e a importância da compartimentalização do metabolismo da prolina. Dependendo do estágio de desenvolvimento, órgãos e condições de crescimento, fusões de GFP-P5CS1 e P5CS2 demonstraram localizações diferentes na célula (plastídios, vesículas ou citoplasma). No mesófilo celular de folhas maduras, estresse salino e osmótico estimularam o transporte de P5CS1 para os cloroplastos, enquanto que a distribuição do pool de P5CS2 no citoplasma e no cloroplasto não foi alterada.

Existem relatos da presença de permeases de prolina localizadas em membranas celulares. Aplicações exógenas de prolina em calos de arroz estressados osmoticamente aumentaram o crescimento dos calos *in vitro* (KISHOR, 1989). Isso indica a existência de transportadores de prolina em plantas. Embora a via biossintética de prolina esteja bem caracterizada em plantas, o seu transporte ainda não está bem esclarecido. Girousse et al. (1999) relatou a importância dos transportadores de prolina na adaptação ao estresse osmótico em alfafa. Altas

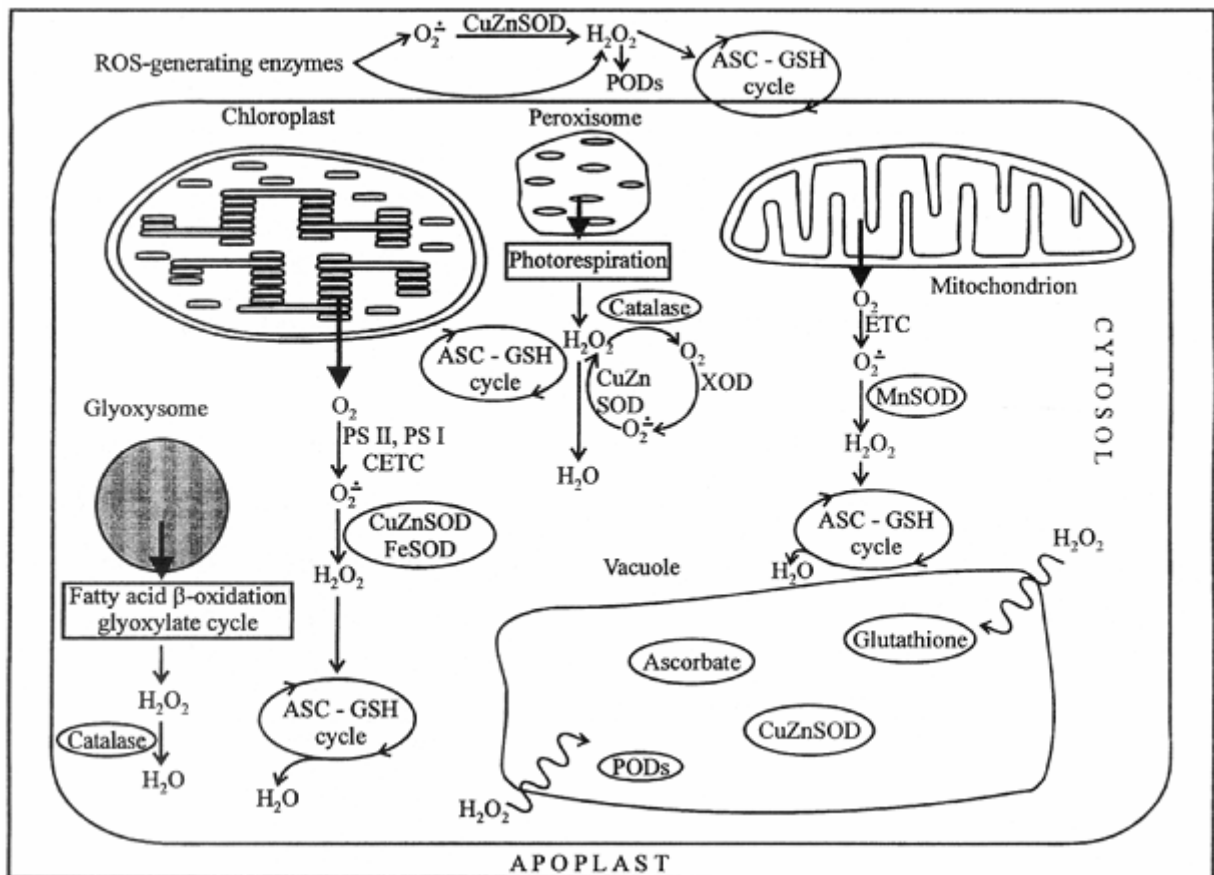
concentrações de prolina foram descritas na seiva xilemática. Armengaud e colaboradores (2004) sugeriram que a síntese de prolina pode estar mais localizada em raízes, porém, a maior parte do produzido seria transportada para outros tecidos. De acordo com Andreasson et al. (2004) a prolina é eficientemente transportada por quatro permeases, incluindo duas nitrogênio-reguladas.

### 3.7 DÉFICIT HÍDRICO E O ESTRESSE OXIDATIVO

Os antioxidantes fornecem informações essenciais sobre o estado celular além de influenciarem a expressão genética associada a estresse biótico e abiótico modulando as respostas de forma a maximizar as defesas da planta (FOYER; NOCTOR, 2005).

Um aspecto comum a todas as condições de estresse é o aumento da produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) (Figura 3), com o concomitante aumento de substâncias e enzimas antioxidantes (ALSCHER et al., 1997) como resultado de desbalanço na produção de oxigênio ativado (FOYER et al., 1994), sugerindo que o sistema de defesa antioxidativo possui um papel fundamental na aquisição de tolerância das plantas (VITÓRIA et al., 2001). A possível função desta resposta pode incluir uma proteção ao aparato fotossintético, preservação da integridade de membranas e proteção de DNA e proteínas (ALSCHER et al., 1997).

O fluxo eficiente da cascata de transporte de elétrons através da planta requer a presença simultânea de elétrons em sua forma oxidada e reduzida. Essa exigência envolve um contínuo fluxo de elétrons para o oxigênio molecular a partir da cadeia respiratória e fotossintética de transporte de elétrons (FOYER; NOCTOR, 2005).



**Figura 3** – Representação esquemática da produção e remoção de espécies reativas de oxigênio em plantas. (KUZNIAK, 2002).

Os efeitos do estresse oxidativo são causados pelas particulares propriedades químicas do oxigênio. A molécula de oxigênio pode ser considerada um biradical porque no estado basal de energia contém dois elétrons desemparelhados com spins paralelos. Para cumprir a sua função biológica, o oxigênio precisa ser reduzido incorporando um elétron por vez como acontece na reação catalisada pela citocromo oxidase (HAMILTON, 1991; MARTINEZ-CAYUELA, 1998). Oxidações metabólicas envolvendo oxigênio molecular são, portanto, dependentes da ativação do oxigênio produzindo espécies tais como “singlet” ( $O_2^*$ ),  $O_2^{\cdot -}$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^{\cdot -}$ , ou seus respectivos derivados formados pela reação com outras moléculas orgânicas ou complexados com metais de transição (VAN BREUSEGEM et al., 2001; GRATÃO et al., 2006).

Os radicais livres, produzidos principalmente pelo oxigênio em sistemas biológicos, são essenciais para diversos processos biológicos como

respiração e fotossíntese. Entretanto, se sua produção não for controlada pode tornar-se destrutivo para células e tecidos (RICE-EVANS et al., 1991). Em plantas, danos causados pelo déficit hídrico induzem ao estresse oxidativo como resultado da produção e acumulação de radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) (BOWLER; VANMONTAGU; INZE, 1992). Essas ROS afetam seriamente o metabolismo de plantas através da oxidação de membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos (SMIRNOFF, 1993; GÓMEZ et al., 1999; HERNÁNDEZ et al., 2001), além de inibir processos fisiológicos como fotossíntese e respiração, interferindo no desenvolvimento da planta.

Além disso, as ROS influenciam a expressão gênica e servem como sinal de transdução de algumas vias metabólicas. Dessa maneira, as ROS atuam como indicadores ambientais e sinalizadores biológicos que ativam e controlam vários programas genéticos em resposta ao estresse (GIROTTI, 2001).

A acumulação de ROS é controlada pela taxa de produção e eliminação por sistemas antioxidantes (MITTLER, 2004). Como indicadores do redox celular e disponibilidade de redutores, as ROS estão entrelaçadas em múltiplos processos celulares. Desta forma, muitas sutilezas de interação entre as vias de sinalização de ROS, genes antioxidantes, e seus resultados a nível celular podem ficar mascaradas (FOYER, 2009).

A indução de enzimas antioxidativas pode ser um reflexo de uma estratégia importante para superar os estresses oxidativos impostos pelas condições adversas do ambiente (FOYER et al., 1997). A maioria das ROS é produto do metabolismo regular das células. Porém, ROS também podem ser produzidas através da ruptura do sistema de transporte de elétrons durante condições de estresses (DAT et al., 2000; VAN BREUSEGEM et al., 2001).

Para amenizar os danos causados pelo estresse oxidativo, as plantas desenvolveram sistemas enzimáticos e não-enzimáticos de remoção de ROS. Entretanto, o funcionamento desses sistemas pode ser interrompido em condições de estresse como seca e altas temperaturas, levando ao aumento na peroxidação lipídica e danos às membranas celulares (ZHANG; KIRKHAM, 1994; DAT et al., 1998).

Enzimas que participam do metabolismo antioxidativo e reações redox relacionadas podem ser distinguidas como: proteínas que agem como

enzimas (utilizam superóxido, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou peróxidos orgânicos como substrato); as envolvidas na manutenção do redox (regeneração de formas reduzidas dos redutores); controlar sinais metabólicos liberados secundariamente (conjugases). Dentro da primeira categoria, as enzimas antioxidantes primárias mais bem estudadas em plantas são as superóxido dismutases – SOD, catalases – CAT e ascorbato peroxidases – APX. A segunda categoria agrupa enzimas como desidroascorbato redutase - DHAR e glutatona redutase - GR, e a terceira categoria é representada por glioxilases, citocromo P450s e glicosil transferases (FOYER; NOCTOR, 2009).

Sob condições moderadas de estresses, os radicais são removidos eficientemente pelo sistema de defesa antioxidativo. Contudo, durante períodos de estresse mais severo, o sistema de remoção pode estar saturado pelo próprio aumento da produção de radicais. Excessivos níveis de ROS resultam em danos ao aparato fotossintético, conduzindo à morte de células e à clorose nas folhas (VAN BREUSEGEM et al., 2001), à destruição de lipídios, de ácidos nucléicos e de proteínas (FOYER et al., 1997). Dessa forma, é necessário um mecanismo para inibir o processo autocatalítico causado pela acumulação de ROS associada à inativação das enzimas antioxidantes. Como mencionado anteriormente, estresses ambientais induzem o acúmulo de moléculas osmoprotetoras. Dentre estas, o aminoácido prolina parece realmente proteger plantas contra danos oxidativos causados por radicais livres (ALIA; MOHANTY, 1991).

A prolina pode aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, já que é capaz de estabilizar estruturas protéicas, além de atuar como removedor de radicais OH<sup>•</sup> e oxigênio singleto (SMIRNOFF; CUMBES, 1989; ALIA; SARADHI; MOHANTY, 1997). O anel pirrolidina presente na estrutura do aminoácido apresenta IP (capacidade de fornecer um elétron) notavelmente baixo, e devido a isso, a prolina é capaz de formar um complexo de transferência de carga, removendo radicais livres com eficiência (AUE; WEBB; BOWERS, 1976).

Tem sido demonstrado que a atividade de enzimas antioxidantes diminui em plantas sob condições de estresse (SHALATA et al., 2001; KHEDR et al., 2003; MISHRA e DAS, 2003; MITTOVA et al., 2004) e que a atividade destas aumenta na presença de prolina como forma de aliviar o estresse (KHEDR et al., 2003). A aplicação exógena deste aminoácido também foi efetiva na detoxificação

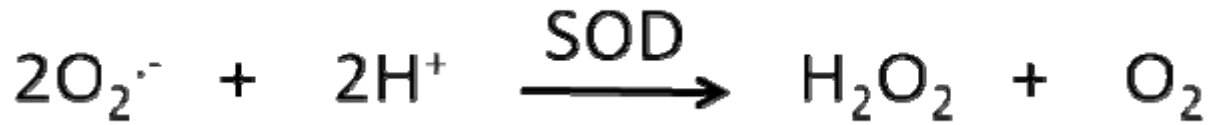
de peróxido de hidrogênio por aumentar a atividade de catalases e peroxidases (HOQUE et al., 2006).

A ausência de uma forte indução por ROS de vários genes de enzimas antioxidantes também reflete a importância da regulação do sistema antioxidante a níveis pós-transcricionais (MAY et al., 1998; PASTORI et al., 2000; SCHMIDT et al., 2002). Muitos genes de enzimas antioxidantes são intensamente expressos mesmo em condições normais (sem estresse), quer seja para lidar com constantes altas taxas de produção de ROS que ocorrem durante a fotossíntese, fotorrespiração e respiração, ou para impedir que flutuações ambientais, como mudança na intensidade luminosa, aumentem estas taxas (VALADARES et al., 1997).

### 3.7.1 Superóxido Dismutase

As SODs são as primeiras enzimas de defesa nas células contra danos provocados por espécies reativas de oxigênio (SCANDALIOS, 2005). Estas proteínas pertencem ao grupo de metaloenzimas que protegem as células dos radicais superóxidos, catalisando a dismutação do  $O_2^-$  em  $O_2$  e  $H_2O_2$  (Figura 4) (WU et al., 1999; VAN BREUSEGUEM et al., 2001). O radical  $O_2^-$  é produzido em qualquer localização intracelular onde exista transporte de elétrons e, portanto, a ativação do  $O_2$  pode ocorrer em diferentes compartimentos celulares (ELSTNER, 1991).

As SODs são as únicas enzimas cujas atividades determinam as concentrações de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ , os dois substratos da reação Haber-Weiss, que origina os radicais  $OH^-$  e talvez por isso, as SODs representam o mecanismo central de defesa do organismo (Bowler et al., 1992; 1994; Alscher et al., 1998).



**Figura 4** – Reação catalisada pela superóxido dismutase (SOD).

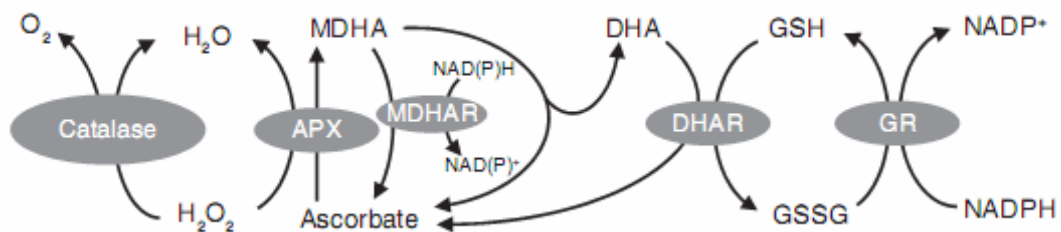
As SODs podem ser classificadas em três tipos de acordo com o metal cofator presente: cobre/zinco, ferro e manganês (RODRIGUEZ-SERRANO, 2007). Em plantas superiores, Cu/Zn-SODs são localizadas nos cloroplastos (OGAWA et al., 1995; ASADA, 2000), citosol (DUKE; SALIN, 1983; BOWLER et al., 1994), peroxissomos e apoplasto (SANDALIO et al., 1997; CORPAS et al., 1998). As SODs cujo cofator é o ferro são localizadas em cloroplastos (BOWLER et al., 1994; Asada, 2000) e peroxissomos (DROILLAR; PAULIN, 1990). As Mn-SODs estão presentes em mitocôndrias (BOWLER et al., 1994; DEL RÍO et al., 2003) e em diferentes tipos de peroxissomos (DEL RÍO; DONALDSON, 1995; CORPAS et al., 1998).

Um estudo sobre o efeito em longo prazo de plantas de ervilha submetidas ao estresse salino evidenciou um papel significativo das defesas antioxidantes dos cloroplastos, mitocôndrias e citosol (HERNANDEZ et al., 1993, 1995, 2000). Posteriormente, Hernandez et al. (1999) ao avaliar um outra cultivar de ervilha também sob estresse salino, identificou duas isoformas presentes nos cloroplastos, Fe-SOD e Cu/Zn-SOD.

Foram identificadas quatro isoformas de SOD em cotilédones de melancia em germinação, sendo que duas são de Cu/Zn-SOD (I e II) e duas de Mn-SODs (I e II). A isoforma Cu/Zn-SOD I estava presente no citosol, enquanto que a II estava localizada nos peroxissomos (SANDALIO; DEL RIO, 1987, 1988). A Mn-SODs I foi encontrada do lado citosólico da membrana no peroxissomo e a Mn-SODs II na mitocôndria.

### 3.7.2 Ascorbato Peroxidase

As APXs são consideradas as enzimas mais importantes na eliminação de  $H_2O_2$  no citosol e nos cloroplastos (Figura 5) (INZE, MONTAGU, 1995). Esta enzima utiliza o ascorbato como seu doador de elétrons específicos para reduzir  $H_2O_2$  em água (SHIGEOKA et al., 2002). De acordo com Del Ríó et al. (1998) e Polle (2001), este ciclo é uma via eficiente para eliminação de peróxido de hidrogênio em compartimentos onde a catalase não está presente, como nos cloroplastos (MITLLER, 2002).



**Figura 5** – Duas das maiores vias para o metabolismo de  $H_2O_2$  em plantas.

Já que o substrato para a APX (ascorbato) tem muitas funções nas plantas, isso se reflete na sua acumulação em muitos tecidos vegetais para concentrações muito superiores aos exigidos para a atividade das APXs (FOYER, 1997; FOYER, HALLIWELL, 1976; NOCTOR, FOYER, 1998).

As isoformas de APX são distribuídas em pelo menos quatro compartimentos celulares distintos: no estroma e ligadas à membrana dos tilacóides nos cloroplastos, ligadas à membrana nos microcorpos, incluindo peroxissomos e glioxissomos, e no citosol (SHIGEOKA et al., 2002). Há ainda uma isoforma de APX ligada à membrana mitocondrial (LEONARDIS et al., 2000).

As diferentes localções subcelulares resultam em propriedades bioquímicas distintas como massa molecular, especificidade de substrato, pH ideal e estabilidade na ausência do ascorbato (ISHIKAWA et al., 1998). A análise filogenética e estrutura organizacional dos genes da APX indicam que as diferentes isoformas surgiram através de um complexo processo evolucionário que envolve

várias duplicações gênicas e sugerem uma relação estreita entre proteínas localizadas no mesmo compartimento subcelular (TEIXEIRA et al., 2004).

Em *Arabidopsis thaliana* foram encontrados pelo menos seis genes que codificam isoformas de APX sendo que duas são citosólicas, duas são do peroxissomos, uma está presente no tilacóide e uma no estroma mitocondrial (CHEW et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2004; DAVLETOVA et al., 2005). Teixeira et al. (2004) identificou uma família multigênica codificando oito isoformas de ascorbato peroxidase em arroz.

Com poucas exceções (TORSETHAUGEN et al., 1997), a importância das APXs citosólicas e cloroplásticas para a homeostase redox celular tem sido demonstrada. Deficiências na função da APX aumentam a suscetibilidade das plantas ao estresse induzido por oxidação, enquanto que a super-expressão favorece esta proteção contra o estresse (PAYTON et al., 2001; KORNYEYEV et al., 2001; YABUTA et al., 2002; KORNYEYEV et al., 2003; MURGIA et al., 2004; DAVLETOVA et al., 2005).

Ascorbato peroxidases de cloroplastos possuem um “turnover” (taxa de substrato transformado por mole de enzima) catalítico muitas vezes maior que as formas citosólicas (KITAJIMA et al., 2007). Entretanto, diferentemente das formas citosólicas, APX de cloroplasto são extremamente suscetíveis à inativação por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (KITAJIMA et al., 2006).

### 3.7.3 Catalase

A catalase descrita em 1901 por Loew (FRIGOLI et al., 1996) é uma enzima tetramérica que contém grupos heme e é encontrada em todos os organismos vivos. Devido à sua ampla distribuição e capacidade de degradar rapidamente o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Figura 5), a catalase desempenha um papel fundamental nos sistemas que capacitam os organismos a viverem em ambientes aeróbicos (MALLICK; MOHN, 2000). Sua atividade depende do NADPH e possui um eficiente mecanismo mesmo sob condições de estresse (MALICK; MOHN, 2000).

As catalases podem ser divididas em três classes: catalases da classe 1 removem o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido durante a fotorespiração em tecidos fotossintéticos; catalases da classe 2 são produzidas em tecidos vasculares e podem exercer uma função de lignificação mas, sua exata função biológica permanece desconhecida; e na classe 3 estão as catalases presentes abundantemente em sementes e plantas jovens, e cuja atividade está relacionada à remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido durante a degradação dos ácidos graxos no glioxissoma (RESENDE et al., 2003).

As evidências sugerem que a catalase utiliza um mecanismo de dois estágios tanto nas reações peroxidativas quanto nas catalíticas. No primeiro estágio, o ferro do grupo heme da CAT interage com o peróxido de hidrogênio para formar um peróxido de ferro rico em oxigênio. Este composto intermediário é denominado componente I. Em baixas concentrações do peróxido, o componente I pode ser reduzido por uma variedade de doadores de hidrogênio (por exemplo, etanol ou ácido ascórbico). Em altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o componente I reage com uma segunda molécula de peróxido para produzir água e oxigênio (SCANDALIOS, 1994).

#### 3.7.4 Glutathione Redutase

A glutathione redutase é uma flavoproteína que catalisa a produção dependente de NADPH da glutathione dissulfeto para a forma reduzida glutathione (Figura 5). Apesar de a enzima ser sintetizada no citoplasma, esta pode ser direcionada tanto para o cloroplasto quanto para a mitocôndria (MULLINEAUX; CREISSEN, 1997). Dois genes codificadores da GR foram identificados em *A. thaliana*, sendo que um codifica a isoforma citossólica e outro a plastidial (XIANG; OLIVER, 1998).

Nas plantas superiores, a maior parte da atividade da GR é localizada nos cloroplastos (CREISSEN et al., 1994). Várias isoformas de GR foram identificadas em tabaco (FOYER et al., 1991) e folhas de ervilha (EDWARDS et al. 1990) sendo que as de cloroplastos eram diferentes das citossólicas. Além disso, duas isoformas foram encontradas em cotilédones de mostarda (DRUMM-HERREL et al., 1989).

### 3.8 PROLINA E O ESTRESSE OXIDATIVO

Ozden et al. (2009) ao estudar o efeito da prolina no sistema antioxidante de folhas de uva quando submetidas a estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio verificou que na presença de prolina exógena, superóxido dismutases e catalases tiveram sua atividade diminuída enquanto que guaiacol peroxidase e ascorbato peroxidases aumentaram a atividade. O pré-tratamento com prolina (20mM) resultou em um decréscimo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> celular e MDA, enquanto que a concentração de prolina na célula decresceu.

Segundo Yan et al. (2000) a prolina pode proteger membranas celulares do estresse oxidativo causado pela salinidade por aumentar a atividade de vários antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos. Por exemplo, o crescimento de suspensão de células de tabaco sob condição de estresse salino foi acrescida de 10mM de prolina, concentração cuja ação da prolina é suposta como capaz de proteger enzimas e membranas (OKUMA et al., 2000). Em soja, culturas de células mantidas sob estresse salino apresentaram aumento da atividade de superóxido dismutases e peroxidases com aplicações exógenas de prolina, o que contribui para o aumento da tolerância ao sal (YAN et al., 2000; HUA; GUO, 2002).

A síntese de prolina está envolvida com o pH e a regulação do redox na célula (ALIA, 1991). Ela também age como uma fonte de reserva de carbono, nitrogênio e energia durante a recuperação do estresse (ZHANG et al., 1997). Enquanto a síntese de prolina gera NADP<sup>+</sup>, sua degradação produz NADPH. Deste modo, um ciclo de síntese e degradação é essencial para tamponar o potencial redox da célula no citosol e plastídios. Além disso, este aminoácido regula a acidez citosólica e mantém as taxas de NAD<sup>+</sup>/NADH, acentua a atividade do fotossistema II em membranas de tilacóides isoladas e impede a perda fotoinibitória da atividade fotoquímica por provocar a redução da peroxidação lipídica. A prolina também está envolvida na proteção de membranas do tilacóide contra radicais livres (SIVAKUMAR, 2000). O ciclo redox é importante para os mecanismos de defesa antioxidante sob condições de estresse.

Já que a prolina pode agir como removedora de oxigênio singlete e radicais hidroxil, ela também tem a capacidade estabilizar proteínas, DNA e

membranas (MATYSIK, 2002). Assim, a prolina é não só uma importante molécula de sinalização redox, mas também uma efetiva removedora de espécies reativas de oxigênio formadas em condição de estresse salino e desidratação nas plantas. Estudos sobre a aplicação *in vivo* de prolina mostraram que este aminoácido promoveu a atividade de catalases e peroxidases. Entretanto, a habilidade da prolina em ativar enzimas pode sugerir uma limitada alteração conformacional (KISHOR et al., 2005).

Análises realizadas com mutantes de *Arabidopsis* apresentando inserção do gene *P5CS* confirmaram o papel *in vivo* da prolina em remover espécies reativas (ROS), o que foi primeiramente postulado por Smirnov e Cumbes (1989). Enzimas do ciclo glutationa-ascorbato removedoras de ROS demonstraram reduzir a atividade das enzimas dos mutantes *p5cs1* quando comparadas com o tipo selvagem sobre estresse salino, sugerindo que a acumulação de prolina implica no controle da estabilidade e atividade de enzimas no ciclo glutationa ascorbato (SZÉKELY et al., 2008).

Hoque et al. (2006) verificou que a aplicação exógena de prolina ameniza os efeitos deletérios provocados pelo estresse devido à habilidade de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes. Além disso, Okuma et al. (2004) observou que a aplicação exógena de prolina estimulava o crescimento de células e plantas, melhorava o metabolismo e reduzia a oxidação de membranas lipídica.

Hong et al. (2000), ao estudar células de tabaco notou que o suprimento exógeno de prolina reduziu por volta de 40% os níveis de radicais livres. De acordo com este trabalho, o aumento da resistência ao estresse oxidativo seria devido à acumulação de prolina e outros metabólitos.

Dados obtidos por Molinari et al. (2007) em estudos realizados com plantas transgênicas de cana-de-açúcar com expressão estresse-induzida do gene *P5CS* submetidas ao déficit hídrico evidenciaram que estas plantas apresentaram eficiência fotoquímica do PSII 65% maior do que plantas controle embora não tenham apresentado ajustamento osmótico nos primeiros nove dias do tratamento. Além disso, quando comparadas com o controle não transformado, folhas de plantas transgênicas tratadas com paraquat (um gerador de espécies reativas) apresentaram maiores conteúdos de clorofila. Esses dados sustentam a hipótese de que a prolina opera na remoção de radicais livres e conseqüentemente na proteção do aparato fotossintético.

### 3.9 PCR EM TEMPO REAL E GENES NORMALIZADORES

Análises de expressão gênica são cada vez mais importantes no campo de pesquisas biológicas. Entender os padrões de expressão dos genes pode levar a uma série de descobertas de complexos mecanismos regulatórios que provavelmente propiciarão a identificação de genes relevantes em processos biológicos (VANDESOMPELE, 2002).

Microarranjos e PCR em tempo real são duas técnicas complementares comumente utilizadas para medir os níveis de expressão gênica (CLARKE; ZHU, 2006). O PCR quantitativo em tempo real tem se mostrado o mais sensível entre os dois métodos (CZECHOWSKI et al., 2004) e é frequentemente usado para confirmar resultados obtidos através de hibridização por microarranjos assim como para realizar estudos mais profundos de um determinado número de genes entre vários tratamentos e tecidos (LIBAUT et al., 2008).

A técnica de PCR em tempo real é um dos métodos mais utilizados para a quantificação de genes devido à sua dinamicidade, sensibilidade, especificidade, não necessidade de processos pós-amplificação e alta reprodutibilidade (WONG; MEDRANO, 2005). Esta metodologia passou a ser utilizadas para monitorar expressão gênica em plantas (GACHON et al., 2004) considerando sua grande habilidade em discriminar genes relacionados e de baixa expressão (CZECHOWSKI et al., 2004).

O PCR em tempo real difere do PCR clássico por detectar o produto de reação a cada ciclo durante a reação. Assim, esta técnica permite o acompanhamento da amplificação durante a fase exponencial da reação e uma determinação precisa da quantidade de material presente (GACHON et al., 2004). Existem diversos métodos de detecção que podem ser utilizados no PCR em tempo real, dentre estes, os mais comuns são o SYBR Green, TaqMan e Molecular Beacons. O SYBR Green se liga entre a fita dupla de DNA e com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico emite uma fluorescência verde. A sua grande vantagem é o baixo custo, facilidade de uso e sensibilidade. Contudo, como esta molécula se liga a qualquer fita dupla de DNA, podem ocorrer produtos inespecíficos superestimando a presença do alvo, e justamente devido a esta característica, sua utilização não permite reações multiplex. Já no caso do método TaqMan, entre os

primers é construída uma sonda de alta especificidade com um “quencher” em uma extremidade e um repórter na outra. Quando a sonda está intacta, isto antes de se iniciar a amplificação, ocorre uma transferência de energia e nenhuma fluorescência é detectada, porém, ao se iniciar a reação, a sonda é quebrada em função da atividade 5'→3' da *Taq* polimerase separando o “quencher” do repórter. Esta separação resulta em um aumento da intensidade da fluorescência. Embora ocorra alta especificidade e possibilite reações multiplex pela utilização de diferentes fluoróforos, este método é comparativamente mais caro que o SYBR Green. Os Molecular Beacons são oligonucleotídeos usados como sonda de fita simples que forma uma estrutura secundária entre as extremidades 5'→3', chamada de loop. Este loop contém uma sequência que é complementar à sequência alvo, sendo que o seu princípio é o mesmo da sonda TaqMan (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Há diversas variáveis que precisam ser controladas em análises de expressão, como quantidade de material inicial, eficiência enzimática, diferenças entre tecidos ou células na atividade transcricional (VANDESOMPELE, 2002), integridade e quantidade de RNA, tratamento experimental e variações entre amostras (WONG; MEDRANO, 2005). Os resultados obtidos através de PCR em tempo real devem ser normalizados com um gene controle interno, cuja expressão não pode variar independente do tratamento experimental aplicado (SCHMITTGEN; ZAKRAJSEK, 2000).

Entretanto, a validação destes genes de referência para diferentes plantas e em condições específicas não tem sido muito estudada (GUTIERREZ, 2008). Embora Czechowski e colaboradores (2005) tenham sugerido uma série de genes candidatos a controle internos diferentes dos que normalmente são utilizados, citações recentes indicam que a importância destes resultados não foi reconhecida. De fato, nos últimos dois anos genes normalizadores putativos ainda continuam sendo utilizados para PCR em tempo real em plantas mesmo não sendo a melhor opção (GUTIERREZ, 2008).

Estudos mostram que a expressão de diversos genes controle, embora constantes em algumas condições experimentais, pode variar consideravelmente com outros tipos de tratamentos (VOLKOV et al., 2003; CZECHOWSKI et al., 2005; NICOT et al., 2005), o que pode levar a interpretações biológicas equivocadas.

Gutierrez et al. (2008) testou através de PCR em tempo real a expressão de diversos genes de referência em diferentes tecidos de *A. thaliana*.

Verificou-se então que estes genes comumente utilizados não são os mais adequados devido à sua instabilidade. Uma variedade de genes controle, como actina (LI et al., 2005; WILLIAMS et al., 2005; DOMOKI et al., 2006), tubulina (JEONG et al., 2006), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (SEKALSKA et al., 2006), RNA ribossomal, poliubiquitina e fator de alongamento 1- $\alpha$ , são comumente utilizados para normalizar dados de PCR em tempo real.

Libault e colaboradores (2008) analisaram dezoito genes candidatos a controle interno em plantas de soja e identificaram quatro como sendo adequados para normalização. Esta recomendação foi feita baseada em análises de suas expressões em 130 condições experimentais diferentes.

A validação de genes normalizadores adequados pode ser feita através da avaliação de dados obtidos a partir de PCR em tempo real com algoritmos estatísticos como geNorm (VANDESOMPELE, 2002), Bestkeeper (PFAFFL, 2004) e Normfinder (ANDERSEN et al., 2004). Pérez et al. (2008) analisaram a estabilidade de dez genes de referência através da utilização destes três softwares e os resultados obtidos se mostraram semelhantes.

O dois métodos de análise experimental mais comumente utilizados são a quantificação absoluta e relativa. A absoluta determina a contribuição do número de cópias do gene, geralmente por relacionar o sinal de PCR obtido com uma curva padrão. Quantificações relativas relacionam o sinal do transcrito do alvo em um determinado tratamento em relação a uma condição controle. O método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  é uma forma indicada de se analisar mudanças relativas na expressão gênica (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Contudo, esta metodologia permite que os cálculos sejam feitos com a utilização de somente um gene normalizador.

Ainda, de acordo com Coulson et al. (2008), apesar dos diversos méritos do PCR quantitativo em tempo real, há uma série de questões inerentes associados com a sua utilização, dentre os quais a identificação de uma referência válida para normalização dos dados continua a ser a mais problemática. Atualmente, o método mais comum para essa normalização é a utilização de um único gene de referência como controle interno. Entretanto, existem evidências na literatura sugerindo que embora em algumas condições a expressão destes genes permaneça inalterada, em outras ela pode flutuar significativamente. Assim, a normalização dos

dados através de um gene de referência não validado pode levar a resultados imprecisos e conclusões errôneas, e estudos anteriores tem reforçado a necessidade de validar genes “housekeepings” previamente à sua utilização em um estudo (DHEDA et al., 2005).

Desta forma, fica evidente que cada experimento possui suas particularidades e a obtenção de dados e análise de resultados devem ser avaliados com minúcia para evitar interpretações errôneas. Os genes normalizadores a ser utilizados devem ser selecionados com base no experimento em questão e não baseados em referências de outros estudos assim como o método de análise, uma vez que a acurácia dos resultados obtidos são dependentes da escolha adequada do gene “housekeeping” que será utilizado para comparações relativas de expressão.

#### 4 ARTIGO A

SELEÇÃO DE GENES NORMALIZADORES PARA PCR EM TEMPO REAL EM CITRUMELEIRO SOB CONDIÇÃO DE DEFICIÊNCIA HÍDRICA

**\*\*A ser submetido à revista BMC Plant Biology.**

**Selection of control genes for real-time RT-PCR normalization in a citrus rootstock (*Citrus paradisi* Macf. x *P. trifoliata*) under drought stress.**

**Carvalho, K.; Campos, M. K. F.; Souza, F.S.; Marur, C. J., Pereira, L. F. P.;  
Vieira, L. G. E.**

SELEÇÃO DE GENES NORMALIZADORES PARA PCR EM TEMPO REAL EM CITRUMELEIRO  
SOB CONDIÇÃO DE DEFICIÊNCIA HÍDRICA

**Carvalho, K.<sup>1,2</sup>; Campos, M. K. F.<sup>3,2</sup>; Souza, F.S.<sup>2</sup>; Marur, C. J.<sup>2</sup>, Pereira, L. F. P.<sup>4</sup>;  
Vieira, L. G. E.<sup>2</sup>**

**Abstract**

**Background:** The elucidation of gene expression patterns leads to a better understanding of biological processes. Real-time quantitative RT-PCR has become the standard method for studies of gene expression. A biologically meaningful reporting of target mRNA quantities requires accurate and reliable normalization in order to identify real gene specific variation. The validation of reference genes have not been defined for a great number of crop species, including citrus. In the present report we describe the evaluation of potential internal controls in the citrus rootstock citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* Macf. x *P. trifoliata*) under drought stress to identify which are the most reliable for transcript quantification by real-time RT-PCR.

**Results:** The expression levels of seven frequently used housekeeping genes (reference genes), namely cyclofilin, cathepsin, actin, GAPDH, elongation factor 1- $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin and ADP- rybosilation factor was assessed by quantitative real-time RT-PCR in citrumelo plants under drought stress. The expression data was analysed using the geNorm algorithm which determines a reference gene stability factor (M), defined as the average pairwise variation of a particular gene compared with all of the other candidate reference genes. Elongation factor 1- $\alpha$ , ADP- rybosilation factor and GAPDH genes, showed the most expression stability during treatment, followed by cathepsin, cyclofilin, actin and  $\beta$ -tubulin that presented higher M values.

**Conclusion:** This work constitutes the first effort for the selection of optimal endogenous controls for quantitative real-time RT-PCR studies of gene expression in a citrus rootstock under drought stress. Based on geNorm algorithm, elongation factor 1- $\alpha$  and ADP- rybosilation factor were the most stable genes and hence superior for normalization in real-time RT-PCR comparative analysis of mRNA expression levels in leaves of citrumelo plants during drought conditions and after stress recovery.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

O estudo de regulações biológicas é frequentemente correlacionado a análises de quantificação. Com o fim de detectar a expressão diferencial de genes

---

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Londrina (UEL)

<sup>2</sup> Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR)

<sup>3</sup> Universidade Federal do Paraná (UFPR)

<sup>4</sup> Embrapa Café

em amostras biológicas distintas, como tipos de tecidos em diferentes condições experimentais, o desenvolvimento da técnica de PCR quantitativo tem transformado a análise de expressão gênica (BARBER et al., 2005). Este método fornece quantificações precisas devido à sua grande sensibilidade e precisão mesmo para os genes com níveis transcricionais reduzidos (BUSTIN, 2005; NOLAN et al., 2006).

Mesmo sendo uma técnica poderosa, PCR em tempo em tempo real também apresenta requisitos especiais, sendo que o mais importante é a necessidade de normalização dos dados através da utilização de genes de referência (housekeepings) (BARSALOBRES-CAVALLARI et al, 2009).

De acordo com Andersen et al. (2004), dados normalizados são um requisito absoluto para a correção de medidas de expressão gênica. A normalização ajusta para diferenças em quantidade e qualidade do material analisado e para diferenças na preparação do RNA e da síntese de cDNA, pois os genes de referência são expostos aos mesmos protocolos de preparação aplicados aos genes de interesse. Os genes comumente utilizados como normalizadores em biologia molecular de plantas geralmente desempenham um papel fundamental nos processos celulares, tais como mantenedores de estruturas celulares e processos metabólicos primários (HONG et al., 2008). A expressão do gene normalizador não pode ser afetada por qualquer contexto biológico, de outra forma, conduz a resultados errôneos (JAIN et al., 2006). Até o momento, diversos genes como  $\beta$ -actina,  $\beta$ -tubulina, RNAr, poliubiquitina, álcool desidrogenase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase tem sido utilizados como genes referência internos para análises de expressão gênica sob o pressuposto de estabilidade de expressão (PAPINI-TERZI et al., 2005; OHL et al., 2006; POMBO-SUAREZ et al., 2008, BONEFELD et al, 2008).

Reconhecendo a importância dos genes de referência na normalização dos dados de PCR em tempo real, a estabilidade de vários destes genes tem sido avaliada sob condições específicas em vários organismos (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009). Em plantas, apenas poucos genes normalizadores tem sido investigados com algum detalhe, como em arroz (JAIN et al., 2006; DING et al., 2004; KIM et al, 2003), batata (NICOT et al., 2005), soja (LIBAULT et al., 2008; JIAN et al.,, 2008) e *Arabidopsis thaliana* (CZECHOWSKI et al., 2005). Até agora, genes adequados para estudos de expressão gênica em citros sob condição de déficit hídrico ainda não foram relatados.

Existem diferentes maneiras de se analisar a aptidão de um gene de referência em um determinado experimento, e estes métodos tem sido comparados com resultados contraditórios (ANDERSEN et al., 2004; SPINSANTI et al., 2006; PÉREZ et al., 2008). De acordo com Pérez et al. (2008), o software geNorm (VANDESOMPELE et al. 2002) parece ser a melhor opção já que proporciona a indicação do número de genes de referência adequado para o estudo, além de indicar o mais estável entre os candidatos.

Buscas na literatura mostraram a ausência de relatos sobre genes de expressão utilizados como padrão em citros submetido a estresse hídrico. Trabalhos desta área têm focado predominantemente o estresse por salinidade, diferentes estádios de desenvolvimento e tecidos em culturas, e não abordam citros. Assim, tendo em vista a importância da utilização e seleção adequada de genes normalizadores, este trabalho como objetivo identificar o gene de referência mais adequado para estudos com citrumeleiro, porta-enxerto de citros, sob condições de deficiência hídrica entre sete genes candidatos: GAPDH, elongation factor 1- $\alpha$ ,  $\beta$ -actina, ciclofilina,  $\beta$ -tubulina, ADP-fator de ribosilação e catepsina.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Material Vegetal

Cinco plantas do porta-enxerto citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* Macfad. Cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), multiplicadas de um clone não transformado por enraizamento de estacas, foram utilizadas para este trabalho.

Os porta-enxertos, de quatro anos de idade, foram mantidos em vasos de plástico com 15 Kg de substrato (3 terra: 1 areia: 1 composto orgânico). Aproximadamente quatro semanas antes do início do experimento, as plantas foram podadas para que apresentassem maior uniformidade. O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) com as plantas dispostas em arranjo inteiramente casualizado.

### 4.2.2 Condições de Déficit Hídrico

As plantas foram submetidas a um período de 13 dias sem adição de água nos vasos, que foram dispostos em posições semelhantes em relação à

incidência de radiação solar. A umidade do substrato nos vasos foi monitorada diariamente com o auxílio de sondas TDR (Time Domain Reflectometry) acopladas ao aparelho Tektronix 1502B Metallic TDR Cable Tester (Tektronix).

O estado da água nas folhas foi monitorado através de psicômetros de termopar (modelo C-30, Wescor, Inc., Logan, Ut, U.S.A.) acoplados a um datalogger (Campbell Scientific, Inc., Logan, Ut, U.S.A., modelo CR-7). A cada dia de leitura, amostras de folhas totalmente expandidas de cada uma das plantas transgênicas e controle foram coletadas e inseridas nos psicômetros. A cada dia de leitura, entre 9h30min e 10h, discos foliares de aproximadamente  $2\text{ cm}^2$  foram dispostos nos psicômetros. O datalogger foi programado para que as leituras fossem efetuadas a cada 10 min até que o equilíbrio da pressão de vapor na câmara fosse verificado. A microvoltagem fornecida pelo sistema foi convertida em potencial da água (MPa) em função de prévia calibração dos sensores com soluções de cloreto de sódio. Após a obtenção do potencial total da água ( $\Psi_t$ ), os sensores foram imersos durante 4 min em nitrogênio líquido e as leituras retomadas para obtenção do potencial osmótico ( $\Psi_s$ ). O cálculo do potencial de pressão foi realizado através de  $\Psi_t - \Psi_s$ .

#### 4.2.3 Parâmetros de Coleta

Para possibilitar a análise do material a partir de condições de turgor semelhantes, os pontos de coleta foram determinados de acordo com o potencial total de água nas folhas. Estes pontos foram denominados de 'sem estresse', 'estresse moderado', 'estresse severo' e 'recuperado' e referem-se, respectivamente, às condições normais de suprimento de água ( $\Psi_t = -1,3\text{ MPa}$ ), estresse moderado ( $\Psi_t = -2,5\text{ MPa}$ ), estresse severo ( $\Psi_t = -3,9\text{ MPa}$ ) e plantas re-irrigadas após atingirem o ponto de estresse severo e que tiveram suas folhas coletadas depois de 24h ( $\Psi_t = -1,3$  a  $-1,9\text{ MPa}$ ).

As avaliações foram feitas em folhas em estágio similar de desenvolvimento coletadas de forma aleatória na região intermediária das plantas. Para cada dia de análise foram feitas três coletas de folhas (*pools*, de folhas). Cada *pool* consistiu de folhas coletadas de cada uma das cinco plantas (clones) e representou uma repetição biológica. As folhas foram imediatamente imersas em

nitrogênio líquido após a coleta. O material foliar foi macerado em N<sub>2</sub> líquido e acondicionado em freezer -80°C até o momento das análises.

#### 4.2.4 Seleção de Genes de Referência e Desenho de Primers

Para identificar homólogos de genes comumente utilizados como controle interno para estudos de expressão gênica, o banco de dados HarvEST Citrus 1.20 ([www. http://harvest.ucr.edu/](http://harvest.ucr.edu/)) com a utilização da opção Assembly C46, foram realizadas buscas de reads (seqüências) referentes aos genes que codificam para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH),  $\beta$ -actina (ACT), fator de alongamento 1- $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ),  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -TUB), catepsina (CtP), ciclofilina (CYP) e ADP- ribosylation factor (ADP) (Tabela 1). Os reads obtidos foram agrupados com a utilização do software Vector NTI 10.3 (Invitrogen) e os contigs resultantes foram confrontados com as seqüências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando BlastX.

As seqüências dos genes foram alinhadas, as ORFs identificadas e as regiões de maior dissimilaridade analisadas através do software CLC Main Workbench para que a construção dos primers.. Para o desenho dos primers foi utilizado o software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) de modo que o amplicon obtido fosse de 80 pares de bases. Os primers e os amplicons para cada gene foram confrontados com as seqüências depositadas no GenBank para confirmar especificidade.

**Tabela 1** – Primers utilizados nas ampliações dos genes normalizadores

Gene	Sigla	Primer senso	Primer reverso	Unigene	ID Público	EST mais representativo
Actina	ACT	CTGCCTGATGGCCAGATCA	CCGATGAGAGATGGCTGGAA	UC46_1045	DN134826	1045
GAPDH	GAPDH	TCTTGCCTGCTTTGAATGGA	TGTGAGGTCAACCACTGAGACAT	UC46_981	CK940059	__
EF1 $\alpha$	EF1 $\alpha$	TCAGGCAAGGAGCTTGAGAAG	GGCTTGGTGGGAATCATCTTAA	UC46_253	CK933743	253, 889
$\beta$ -tubulina	$\beta$ -TUB	CACCTTCATCGGGAACCTCAAC	TTCTCCTAAACATAGCTGTGAATTGC	UC46_1848	CK938351	1848, 1850, 1854
Catepsina	CtP	AAAACCAGCTTTGGAGGAATTCA	TGCCATTATGTCCTCTGGATCA	UC46_2546	CN181820	2546
Ciclofilina	CYP	AACGGATCTCAGTTCTTCGTCTGT	TCGACGACTTGACCGAACAC	UC46_1312	EX446899	1312
ADP- ribosylation factor	ADP	CACCACCATTCTACCATTGG	CCCCGACATCCCAGACAGTA	UC46_79	DY257023	79, 307

#### 4.2.5 Extração de RNA

O RNA total das folhas foi extraído pelo método Chang (1993) com algumas modificações. Aproximadamente 1g de tecido foliar previamente macerado em N2 líquido foram homogeneizados em 20 mL de tampão CTAB contendo 400µL de β-mercaptoetanol. Após a homogeneização os tubos foram colocados em banho-maria a 65 °C por 20 min. A solução foi então centrifugada a 7500 rpm por 5 min e o sobrenadante vertido em um novo tubo. Foi adicionado 1 vol. de clorofórmio e feita a homogeneização e centrifugação a 7500 rpm por 5 min. A fase superior foi recolhida e fase de clorofórmio feita novamente. Em seguida, adicionou-se cloreto de lítio de modo que no tubo a concentração fosse 2,5 M sendo que a fase de precipitação foi feita *overnight* a 4 °C.

A solução foi centrifugada a 7500 rpm por 30 min a 4 °C, o sobrenadante descartado e o pellet lavado com cloreto de lítio 2,5 M. Posteriormente foi feita uma centrifugação nas mesmas condições por 5 min. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* ressuspendido em 1mL de tampão DNase contendo 0,5 µL de RNase OUT. Incubou-se por 1 h a 37 °C e em seguida foi adicionado 1 vol. de fenol/ clorofórmio. Novamente fez-se a centrifugação para a retirada da fase superior que foi acrescida de 1 vol. de clorofórmio seguido de centrifugação. A fase superior resultante foi retirada e acrescentou-se 0,3 vol. de acetato de sódio e 3 vezes o vol. de etanol 100%.

A precipitação foi feita *overnight* a -20 °C. Posteriormente centrifugou-se a 7500 rpm por 30 min a 4 °C, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi lavado com etanol 70%. Foi feita então uma centrifugação a 1100 rpm por 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o pellet secado antes de ressuspender em 30 µL de água DEPC (0,1%).

As amostras de RNA foram purificadas com a utilização do Kit Pure Link Micro to Midi Total RNA Purification System (Invitrogen) e em seguida foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), utilizando tampão TAE 1x (2M Tris – acetato, 0,05 M EDTA) para verificar a qualidade e integridade das amostras. O RNA extraído foi quantificado pelo método espectrofotométrico a 260nm e a pureza foi avaliada em um comprimento de onda de 260nm/280nm (Spectronic Unicam

Genesys™). Para confirmação, a quantificação foi feita também através do kit quant-iT™ RNA Assay 5-100 ng (Qubit® fluorometer - Invitrogen).

As amostras foram tratadas com DNase-RNase free para eliminar contaminação com DNA e a integridade do RNA purificado foi confirmada por eletroforese desnaturante em gel de agarose. Subunidades 28S e 18S de RNAr foram observadas no gel indicando a integridade do RNA. Também, as amostras de RNA foram usadas para amplificação por PCR com *primers* do gene GAPDH e, em seguida, submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) com tampão TAE, contendo brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e visualizados sob luz UV para verificar presença de bandas.

#### 4.2.6 Teste de Eficiência de Primers

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen) partindo de  $5\mu\text{g}$  de RNA total extraído das folhas. Este cDNA foi submetido a uma reação de PCR, com os *primers* específicos de cada gene, de acordo com as seguintes condições:  $94^{\circ}\text{C}$  5 min,  $94^{\circ}\text{C}$  1 min,  $60^{\circ}\text{C}$  1 min,  $72^{\circ}\text{C}$  2 min, ciclo repetido 40 vezes,  $72^{\circ}\text{C}$  5 min. A eletroforese dos produtos de PCR foi feita em gel de agarose 1% (p/v) com tampão SB (NaOH 10mM pH 8,5) para verificar se os *primers* estavam amplificando somente a região de interesse de 80 pares de bases.

As diluições para o cálculo de eficiência de *primers* partiram de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de RNA total presentes em  $30\mu\text{L}$  de água DEPC até se atingir a concentração  $10^{-3}$ . A curva obtida, plotando-se os valores de Ct em função do logaritmo das diluições forneceu um valor de *slope* que foi aplicado na fórmula  $E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1]$ . Os parâmetros de ciclagem utilizados para as reações foram:  $50^{\circ}\text{C}$  3 min,  $95^{\circ}\text{C}$  5 min, 40 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  15 seg e  $60^{\circ}\text{C}$  30 seg,  $40^{\circ}\text{C}$  1 min. As curvas de dissociação foram analisadas para cada par de primer visando verificar a presença de somente um pico gene-específico e ausência de “primer dimmers” (eficiência de amplificação dos primers em anexo).

#### 4.2.7 PCR em Tempo Real

O perfil transcricional dos genes de referência foi detectado através de PCR em Tempo Real (modelo 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystem) utilizando o kit Superscript<sup>TM</sup> III Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green One-Step qRT-PCR conforme recomendação do fabricante, com um volume final de reação de 25 $\mu$ L.

As reações foram montadas na placa em duplicata (HELLEMANS et al., 2007) para cada uma das três repetições biológicas representadas pelos pools de folhas coletados nos diferentes tratamentos.

#### 4.2.8 Análise dos Dados

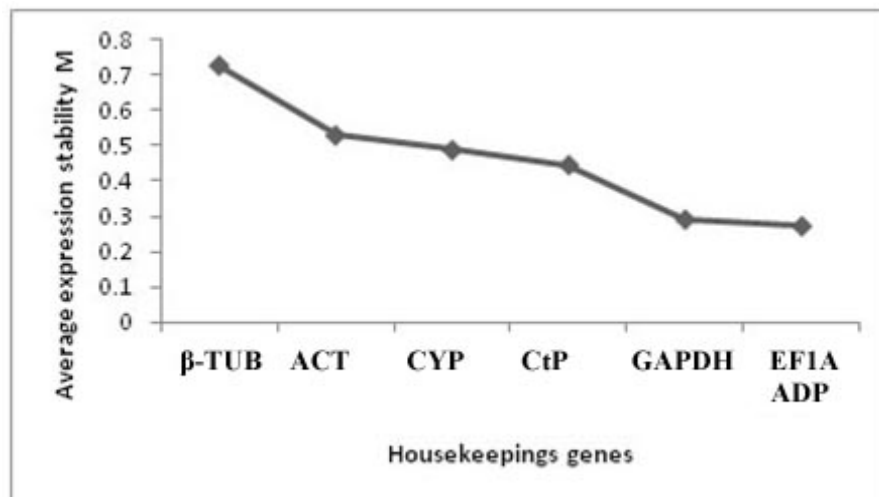
A média dos valores de Ct para as replicatas de cada amostra foram transformadas em dados brutos, quantidades não normalizadas (Q) usando o método  $\Delta$ Ct comparativo pela equação  $Q = E^{-\Delta Ct}$ . A eficiência de reação para cada gene em questão é representada por E e  $\Delta Ct = \min Ct - CtA$ , sendo que o min Ct é o Ct de menor valor entre as amostras do experimento, e o CtA é o valor de Ct da amostra que está sendo transformada. Os dados de expressão foram analisados utilizando o algoritmo geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002) que determina o fator de estabilidade do gene normalizador (M). Este é definido como média de variação aos pares ('pairwise variation') de um gene em particular comparado com todos os outros genes normalizadores candidatos. Com isso, um baixo valor de M indica uma alta estabilidade do gene normalizador.

Amostras de folhas de citrumeleiro cv. Swingle coletadas na parte intermediária foram utilizadas para a extração e purificação de RNA total, que mostrou, após eletroforese desnaturante, bandas intensas e claras de RNA ribossomal 18S e 25S. As amostras de RNA foram diluídas em água DEPC 0,1%. O nível de contaminação com DNA genômico em cada amostra de RNA foi estimado através de PCR para amplificação com primers do gene GAPDH e, em seguida, submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) com tampão TAE, contendo brometo de etídio (0,5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) e visualizados sob luz UV para verificar presença de bandas.

As eficiências de amplificação dos primers, obtidas através da construção de uma curva padrão utilizando concentração relativa VS. cycle threshold (Ct), sendo que a maior parte revelou valores próximos de 100%. Os cálculos de eficiência a partir da curva foram derivados da fórmula  $E = 10^{1/\text{slope} - 1}$ .

#### 4.3 RESULTADOS

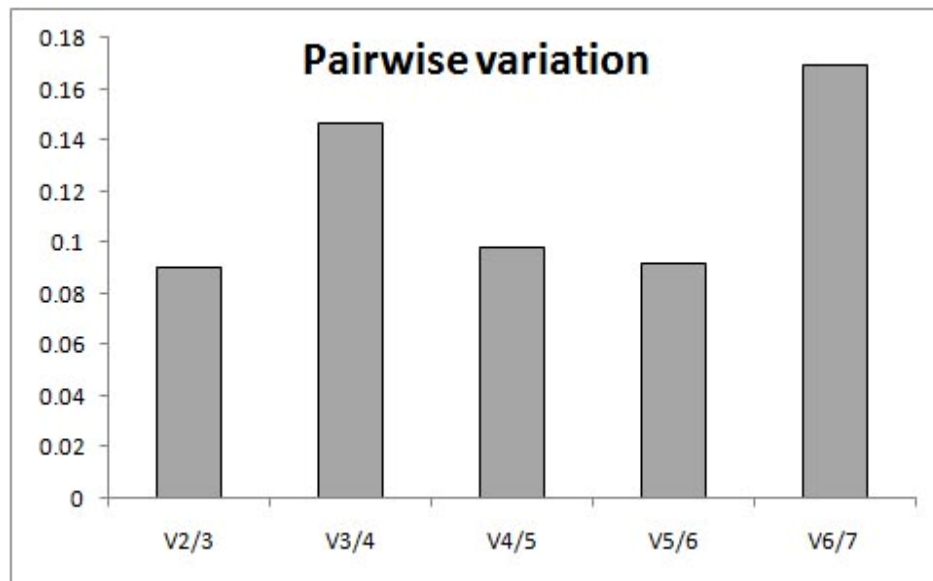
Todas as amostras foram submetidas à análise de expressão em PCR em tempo real e os dados gerados foram analisados no software geNorm. Foi possível verificar que os genes que codificam para EF1 $\alpha$ , ADP e GAPDH apresentaram expressão mais estável durante os dois níveis de deficiência hídrica e na recuperação do estresse, seguidos pelos genes *CtP*, *CYP*, *ACT* e  $\beta$ -*TUB* que apresentaram valores mais altos de M (Figura 6).



**Figura 6** – Estabilidade de expressão gênica dos genes normalizadores candidatos. Baixos valores de M indicam maior estabilidade.  $\beta$ -*TUB* ( $\beta$ -tubulina), *ACT* (actina), *CYP* (ciclofilina) *CtP* (catepsina), *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *EF1 $\alpha$*  (fator de alongamento 1 $\alpha$ ), e *ADP* (*ADP-ADP-fator de ribosilação*).

Além disso, para se avaliar a necessidade de se incluir mais que um gene normalizador, foi calculada a variação aos pares ('pairwise variation' - V). Uma grande variação indica a necessidade de adição de mais um gene normalizador para uma análise confiável. De acordo com Vandesompele et al. (2002) o valor de corte atribuído é de 0,15. Assim, como o valor de V2/3 é de aproximadamente 0,09 (Figura 7), primeira combinação com valor abaixo do estabelecido para corte, a inclusão de um terceiro gene normalizador não é necessária. Desta forma, os normalizadores

selecionados foram os genes que codificam para fator de alongamento-1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) e ADP-fator de ribosilação (ADP).



**Figura 7** – Avaliação do número ótimo de genes normalizadores. O valor V2/3 abaixo de 0,15 indica a não necessidade da adição de um terceiro gene normalizador.

#### 4.4 DISCUSSÃO

Quantificação de níveis de expressão gênica é um passo fundamental em todos os aspectos da biologia molecular. E é particularmente importante quando genes expressos em condições específicas são comparados. Técnicas experimentais comumente utilizadas para avaliar níveis de expressão incluem hibridização por Northern blot e transcriptase reversa mediada por PCR; estas técnicas são práticas por analisarem a expressão de uma pequena quantidade de genes e são complementadas por análises de microarranjos, o que é rotineiramente empregada em larga escala, para estudos de perfis globais de expressão. Recentemente, o método de quantitativo de PCR em tempo real têm se tornado o método de escolha para medir os níveis de expressão gênica em várias amostras envolvendo um número limitado de genes. Esta metodologia fornece quantificações precisas e sensíveis de níveis transcricionais dos genes, mesmo para aqueles com baixas taxas de transcritos (BUSTIN, 2005; BUSTIN et al., 2005; NOLAN et al., 2006). Além disto, a técnica de Northern blot, anteriormente a mais utilizada, requer mais tempo e quantidade de RNA disponível (DEAN et al, 2002).

A expressão de um gene alvo é geralmente normalizada relativamente a um gene de referência (controle interno), o qual pressupõe possuir níveis estáveis de expressão dos transcritos nos tecidos estudados (ISKANDAR et al., 2004). Entretanto, diversos estudos mostram que estes genes podem variar dependendo da condição experimental (WARRINGTON et al., 2000; STURZENBAUM; KILLE, 2001; RADONIC et al., 2004).

Também, antes da escolha de qualquer gene como padrão de referência interno é necessário uma busca exaustiva para certificar de que estes genes não sofrem regulação. Porém, isto pode ainda não ser suficiente. Cada condição experimental possui suas particularidades e séries de genes de referência devem ser selecionados e testados antes de serem utilizados como normalizadores. Se possível, utilizar mais do que somente um gene de referência para que os dados sejam mais precisos. Com a normalização adequada, a variação biológica entre grupos de experimentos se tornam quantificáveis confiavelmente

Em 2001, Sturzenbaum e Kille descreveram nove genes para normalização de sinais de expressão. Os mais comumente utilizados são a actina, GAPDH, EF1 $\alpha$ , ciclofilina, tubulina e genes ribossomais (BEZIER et al., 2002; DEAN et al., 2002; THOMAS et al., 2003; WILLIAMS et al., 2003). Entretanto, transcritos de genes ribossomais estão presentes em níveis de diversas ordens de magnitude maiores que transcritos de genes que codificam proteínas, e sua medição requer diluição da amostra se eles forem usados como referência para medir RNAm. Diluir amostras pode ser inconveniente e introduz uma fonte de erro em potencial (ISKANDAR et al., 2004).

Existe uma série de programas baseados na plataforma Excel que permitem a avaliação de múltiplos genes de referência (HUGGETT et al., 2005). Um destes, o GeNorm, permite que o genes de referência mais apropriado seja escolhido usando a média geométrica da expressão do cDNA candidato (VANDESOMPELE et al., 2002). O programa BestKeeper também seleciona o gene menos variável através do uso da média geométrica mas usa dados brutos (PFAFFL et al., 2004). Um terceiro programa, o Norm-finder, não apenas mede a variação da expressão como também classifica os genes de referência em potencial pela forma como eles se comportam em grupos experimentais distintos (ANDERSEN et al., 2004).

Vandesompele et al. (2002) também defende o uso de múltiplos genes de referência em vez de confiar em somente um transcrito de RNA. Entretanto, nem sempre é possível medir vários genes de referência devido à viabilidade de amostras e custos. Além disso, mesmo que múltiplos genes de referência sejam escolhidos a resolução do ensaio permanece dependente da variabilidade do gene de referência escolhido (HUGGETT et al., 2005).

Neste estudo, os genes que apresentaram maior estabilidade de expressão, e conseqüentemente, recomendáveis para serem utilizados como normalizadores em estudos com citros submetidos à seca são os genes que codificam para fator de alongamento-1 $\alpha$ , ADP-fator de ribosilação, seguidos pelo genes GAPDH.

Estudos com batatas expostas a estresse salino, frio e luz intensa mostraram que dentre os genes de referência adenina fosforibosil transferase, ciclofilina, 18S RNAr, tubulina, actina e o fator de alongamento 1 $\alpha$ , este último foi o único “housekeeping” testado que não foi influenciado por nenhum dos três tratamentos aplicados e portanto pode ser utilizado como normalizador (NICOT, 2005). Os genes que codificam para tubulina e actina foram os que apresentaram os piores níveis de estabilidade, principalmente quando submetidos a estresse por frio e salinidade, o que corrobora os resultados obtidos neste trabalho com plantas de citros submetidos a estresse.

Os genes da actina e tubulina são frequentemente citados como normalizador na quantificação da expressão transcricional em plantas (BEZIER et al., 2002; LANGER et al., 2002; THOMAS et al., 2003; KIM et al. 2003; CZECHOWSKI et al., 2005). Entretanto, neste estudo, estes genes não se mostraram adequados devido à variabilidade de expressão apresentada durante os diferentes tratamentos utilizados. Hong e colaboradores (2008) avaliaram nove genes candidatos em *Brachypodium distachyon*, incluindo os genes que codificam actina, EF1 $\alpha$  e GAPDH. Foram analisadas amostras de cinco diferentes tecidos, quatro estádios de desenvolvimento e quatro estresses abióticos diferentes (salinidade, frio, calor e seca). Em condições de seca e salinidade os melhores genes foram os *SamDC*, *UBC18* e *EF1 $\alpha$* . Especificamente na condição de deficiência hídrica os genes actina e  $\alpha$ -tubulina apresentaram os piores níveis de estabilidade. Também, o gene *GAPDH* mostrou-se pouco estável em todos os tratamentos.

Nossos dados mostraram que o gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) apresentou valores de estabilidade (M) muito próximos aos dos genes EF1 $\alpha$  e ADP, o que indica que este gene é adequado para normalizar dados de expressão relativa em estudos de estresses hídricos em plantas cítricas. A gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase é uma enzima glicolítica abundante associada a uma alta demanda de energia pelas células durante crescimento e diferenciação celular, Apesar destes processos serem bastante afetados em condições de estresses abióticos, este gene mostrou-se apropriado para servir como controle endógeno nas condições experimentais usadas neste trabalho. Os resultados aqui obtidos enfatizam a importância de estudos para espécies e condições experimentais específicas, pois diferentemente do encontrado neste trabalho Exposito-Rodriguez et al. (2008) mostraram que de onze genes candidatos a housekeepings para estudos relacionados ao estágio de desenvolvimento do tomate, o GAPDH e o EF1 $\alpha$  não apresentaram resultados satisfatórios para o seu emprego como normalizadores.

Barsalobres-Cavallari et al. (2009) avaliaram diversos potenciais candidatos a gene de referência (álcool desidrogenase, poliubiquitina, actina, GAPDH, cisteína proteinase, cafeína sintase, proteína ribossomal 60S L7) em raízes, caule, folha, flor e frutos de café. Para validar a seleção dos genes de referência foi utilizado os programas geNorm, Normfinder e BestKeeper. Foi possível verificar que a expressão dos genes variou entre os tecidos, contudo, o que apresentou uma maior estabilidade foi o GAPDH seguido pela poliubiquitina e proteína ribossomal 60S L7. Estudos realizados com cana de açúcar em diferentes estágios de desenvolvimento mostraram que os genes para RNAr e GAPDH foram os mais consistentes como genes de referência (ISKANDAR et al, 2004). Embora as condições experimentais e espécie sejam diferentes, o GAPDH, no presente estudo, também se mostrou um bom candidato a gene de referência, já que sua variabilidade de expressão durante os dois níveis de estresse hídrico aplicados e durante a recuperação das plantas foi bastante reduzida.

A estratégia de comparação aos pares, acessível através do geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), foi a opção utilizada neste trabalho para verificar a estabilidade de expressão dos genes normalizadores para estudos de deficiência hídrica no porta-enxerto e citros, citrumeleiro Swingle. Esta estratégia baseia-se no princípio de que variações nas taxas de expressão de dois genes de referência

refletem o fato de que pelo menos um dos dois genes não é constantemente expresso. Sua principal vantagem é permitir um controle fino da variação da quantidade de cDNA já que as oscilações associadas à variabilidade técnica afeta os dois genes igualmente (EXPOSITO-RODRIGUEZ et al. 2008).

O valor de referência para avaliar a relevância do valor de corte do geNorm, que indica que a inclusão de um gene de referência adicional não é necessária, foi especificada pelos autores do programa como sendo de 0,15 (VANDESOMPELE et al., 2002). Assim, a análise de variação aos pares mostrou que dois genes são suficientes para normalizar os dados de PCR em tempo real nas condições aqui testadas. Isto é, a adição de um terceiro gene de referência na combinação fator de alongamento  $1\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) e ADP-fator de ribosilação (ADP) não é significativa, já que o valor de V obtido foi abaixo do limite estabelecido. Entretanto, 0.15 não é um valor imposto e sim um valor ideal. Desta forma, a tendência observada na mudança dos valores de variação aos pares ('pairwise variation') quando um novo gene é adicionado é igualmente informativa (HONG et al., 2008).

Argumenta-se que a maior fraqueza da abordagem de comparação aos pares é a sua sensibilidade para a co-regulação, que aparentemente tende a selecionar os genes com o maior grau de semelhança no seu perfil de expressão (ANDERSEN et al., 2004). Entretanto, convém salientar que a estabilidade medida prevista pelo geNorm (M) é a média de variação aos pares entre um gene e todos os outros candidatos, e portanto, um par de genes altamente co-regulados é eliminado durante o processo de seleção se eles demonstrarem elevada variabilidade inter-amostra. Uma previsão óbvia sobre o comportamento de dois genes co-regulados na abordagem de variação aos pares é que eles possuirão valores semelhantes de M (valor que indica estabilidade) (EXPOSITO-RODRIGUEZ et al., 2008). Os genes escolhidos para analisar a estabilidade de expressão durante o tratamento de seca em citros não participam de processos biológicos interrelacionados, assim, é pouco provável que os valores próximos de M obtidos pelos genes EF1 $\alpha$ , ADP e GAPDH sejam devidos à presença de co-regulação. O fator de alongamento  $1\alpha$  é uma proteína necessária para a adição de aminoácidos às cadeias de polipeptídeos crescentes nos ribossomos. Além da sua ligação ao RNAm (LIU et al., 2002; MICKLEBURGH et al., 2006), ele se liga e agrupa filamentos de actina (EJIRI, 2002), separa microtúbulos (SHIINA et al., 1994) e media a degradação de proteínas em vias dependentes de ubiquitina (GONEN et al., 1996). O ADP- fator de ribosilação é

um componente crítico de diferentes vias de tráfico vesicular em todas as células eucarióticas e ativadores de fosfolipases específicas (COSSON; LETOURNEUR, 1997; MIURA, 2002; MOSS; VAUGHAN, 1995). Já o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é uma enzima que catalisa a sexta etapa da glicólise e, portanto, serve para quebrar glicose para a energia e moléculas de carbono.

Além desta função metabólica estabelecida, GAPDH foi recentemente implicado em vários processos não metabólicos, incluindo a ativação de transcrição e o início da apoptose (TARZE et al, 2007).

Existem poucos estudos que avaliaram o potencial de genes a genes de referência em diversas condições experimentais. Em plantas, estes estudos são ainda mais incipientes do que com trabalhos realizados com material humano, especialmente com relação a estudos de expressão transcricional de genes em condições de déficit hídrico e durante a recuperação do estresse. Desta forma, este trabalho vem a contribuir com a identificação de três genes que podem ser utilizados como genes normalizadores em experimentos com plantas cítricas onde a deficiência hídrica é o fator estressante. Baseado na estabilidade de expressão, nossos dados sugerem o uso dos genes do fator de alongamento  $1\alpha$  (EF1 $\alpha$ ), da ADP – fator de ribosilação e da GAPDH. Este parece ser o primeiro estudo realizado com plantas cítricas submetidas ao déficit hídrico para identificação de normalizadores para PCR em tempo real.

Os primers utilizados neste trabalho foram escolhidos por representar regiões altamente conservadas desses genes em outras espécies de citros. Desta forma, possivelmente os genes normalizadores aqui selecionados poderiam ser utilizados para trabalhos similares de análise de expressão transcricional de laranja doce (*Citrus sinensis*) submetidos a condições de deficiência hídrica.

**5 ARTIGO B**

EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CITRUMELEIRO 'SWINGLE' COM ALTO ACÚMULO DE PROLINA SUBMETIDO AO DÉFICIT HÍDRICO.

\*\*A ser submetido à revista BBA- Gene Structure and Expression.

**Carvalho, K.; Campos, M. K. F.; Souza, F.S.; Marur, C. J., Pereira, L. F. P.;  
Vieira, L. G. E.**

EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CITRUMELEIRO 'SWINGLE' COM ALTO ACÚMULO DE PROLINA SUBMETIDO AO DÉFICIT HÍDRICO.

**Carvalho, K.<sup>1,2</sup>; Campos, M. K. F.<sup>3,2</sup>; Souza, F.S.<sup>2</sup>; Marur, C. J.<sup>2</sup>, Pereira, L. F. P.<sup>4</sup>;  
Vieira, L. G. E.<sup>2</sup>**

## 5.1 INTRODUÇÃO

A citricultura é freqüentemente exposta a climas secos, já que é uma cultura perene de longo período produtivo. A maioria das regiões produtoras de citros no Brasil apresenta um volume adequado de chuvas para a cultura, entretanto, o mais importante é a distribuição pluviométrica. De acordo com Doorenbos e Kassan (1979) e Cunha e Bergamaschi (1992), períodos com precipitação inferior a 50-60 mm são considerados períodos de déficit hídrico. Chuvas abaixo do normal de maio a agosto na região citrícola brasileira são freqüentes, afetando negativamente a cultura. Em anos com distribuição irregular de chuvas, podem ocorrer perdas de 20% (ORTOLANI et al., 1991). Além de afetar a produtividade e aumentar os custos envolvidos no processamento de suco (IEA, 2000), déficits hídricos podem também agravar os sintomas de certas doenças, podendo inclusive causar a morte de plantas doentes (ABECITRUS, 2007).

Quando as plantas são submetidas a estresses ambientais como seca, e salinidade, ocorre a produção de diversas espécies reativas de oxigênio (ROS), como radicais superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais hidroxil ( $OH^-$ ) e oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) (JUANG, 2004). Os radicais livres, produzidos principalmente pelo oxigênio em sistemas biológicos, são essenciais para diversos processos biológicos como respiração e fotossíntese. Entretanto, se sua produção não for controlada pode tornar-se destrutivo para células e tecidos (RICE-EVANS et al., 1991). O balanço entre a produção e a remoção de ROS é controlado por estes

---

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Londrina (UEL)

<sup>2</sup> Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR)

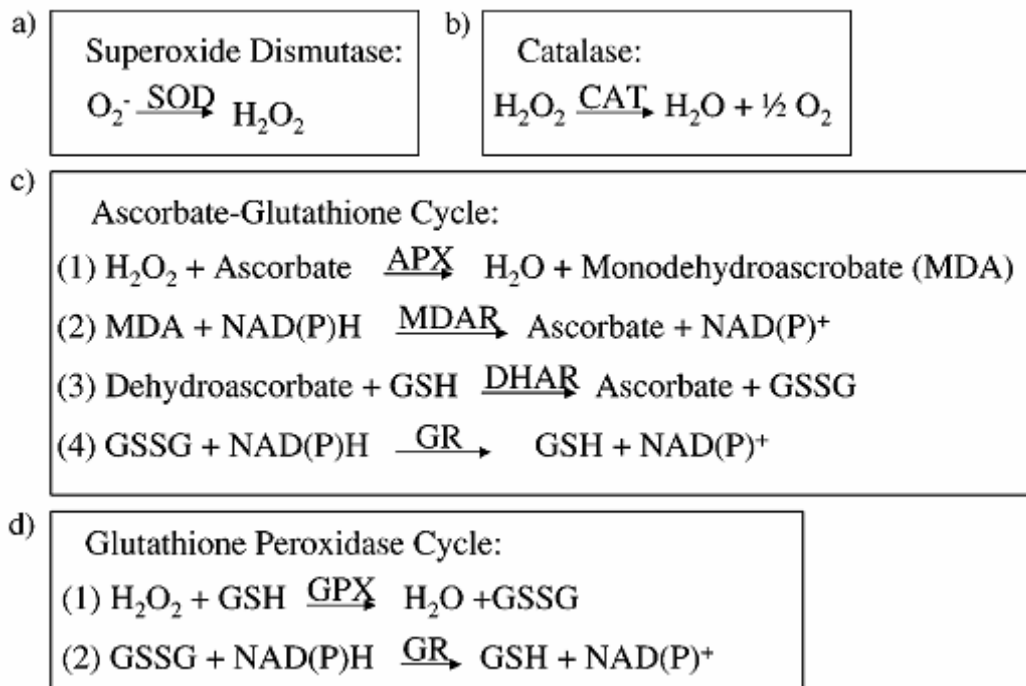
<sup>3</sup> Universidade Federal do Paraná (UFPR)

<sup>4</sup> Embrapa Café

sistemas antioxidantes (APEL; HIRT, 2004). Entretanto, sob condições severas de estresse, este sistema pode ficar sobrecarregado acarretando em danos oxidativos aos componentes celulares incluindo clorofila, membranas lipídicas, proteínas e DNA, podendo levar a célula à morte (MOLASSIOTIS et al., 2006). Para proteger as células das injúrias do estresse oxidativo, as plantas contam com o auxílio de diversas enzimas antioxidantes como ascorbato peroxidases (APX), superóxido dismutases (SOD), catalases (CAT) e glutathione redutases (GR) (LU et al., 2007). Superóxido dismutases são a primeira linha de defesa contra os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio catalisando a dismutação do  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$  (Figura 8 a) (GÓMEZ et al, 2004). As SODs são classificadas de acordo com o metal co-fator presente: FeSOD, MnSOD e CuZnSOD. As FeSOD estão localizadas em cloroplastos (VAN CAMP et al., 1996; MENEGUZZO et al, 1998), as CuZnSOD são as mais abundantes e estão presentes no citosol, cloroplastos, peroxissomos e apoplasto (OGAWA et al., 1997). MnSODs são predominantemente encontradas nas mitocôndrias mas também já foram relatadas em peroxissomos (SANDALIO et al, 1987).

As APXs possuem o papel mais importante na remoção de ROS e estão distribuídas como isoenzimas em diferentes compartimentos celulares como citosol, mitocôndria, cloroplastos e peroxissomos (TEIXEIRA et al., 2006). Estas enzimas desintoxicam o peróxido de hidrogênio produzido pelas SODs (Figura 8 c-1) (GÓMEZ et al., 2004), papel também exercido pelas catalases (Figura 8 b) (KUMAR et al, 2006), e a sua atividade requer a presença de ascorbato.

As glutathione redutases reduzem glutathione oxidada (GSSG) em uma reação que utiliza NADPH (APEL; HIRT, 2004), e assim como as APXs também quebram  $H_2O_2$  em água (Figura 8 c-4). As GRs estão distribuídas em cloroplastos e no citosol, as catalases estão presentes em sua maioria no citosol.



**Figura 8** – Principais meios de remoção de ROS. As superóxido dismutases (SOD) convertem radicais superóxido em peróxido de hidrogênio. Catalases (CAT) convertem o peróxido em água. O peróxido de hidrogênio também pode ser convertido em água pelo ciclo ascorbato-glutationa. O agente redutor na primeira reação catalisada pelas ascorbato peroxidases (APXs) é o ascorbato, o qual oxida em monodeidroascorbato (MDA). A MDA redutase (MDAR) reduz MDA em ascorbato com o auxílio de NAD(P)H. A desidroascorbato (DHA) é produzida espontaneamente pelo MDA e pode ser reduzida a ascorbato pela DHA redutase (DHAR) com a utilização de glutathione (GSH) que é oxidada a glutathione oxidada (GSSG). O ciclo é fechado com as glutathione redutases (GRs) convertendo a GSSG novamente em GSH com o agente redutor NAD(P)H. O ciclo glutathione peroxidase (GPX) converte peróxido de hidrogênio em água. A glutathione oxidada é novamente convertida em glutathione pela GR e o agente redutor NAD(P)H.

Outra resposta comum em plantas submetidas a estresses abióticos é a acumulação de solutos orgânicos compatíveis como a prolina (SERRAJ; SINCLAIR, 2002). A prolina é um aminoácido altamente solúvel e não tóxico além de possuir baixo peso molecular (ASHRAF; FOOLAND, 2007). A prolina em plantas constitui menos que 5% dos aminoácidos totais livres em condições normais, mas sob várias formas de estresse a sua concentração pode chegar a 80% do “pool” total de aminoácidos (Alia, 2003). O acúmulo de prolina em plantas varia de espécie para espécie e pode ser até cem vezes maior em situações normais em algumas plantas do que em condições de estresse em plantas que possuem pouca capacidade de produzir este aminoácido (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008).

O acúmulo de prolina em resposta ao estresse salino ou hídrico em plantas é primariamente localizado no citosol (KETCHUM et al., 1991; PAHLICH et al., 1993). Tem sido proposto que a prolina pode atuar como chaperonas moleculares estabilizando a estrutura de proteínas, e a sua acumulação pode prover uma regulação de pH citosólico e balancear o status redox da célula. Além disso, este aminoácido também parece estar envolvido na sinalização do estresse influenciando as respostas adaptativas (MAGGIO et al., 2002).

Estudos têm sugerido que a prolina além de atuar como osmoprotetora e removedora de radicais livres, também pode alterar a atividade de enzimas antioxidantes (SAIRAM et al., 2002; KHEDR et al. 2003; OZDEN et al., 2009). Também, uma quebra rápida de prolina é uma forma de aliviar o estresse por prover agentes redutores suficientes que apóiam a fosforilação oxidativa mitocondrial e geração de ATP para que a planta se recupere do estresse e repare os danos acumulados (HARE et al., 1998).

Os conhecimentos do papel da prolina na remoção de ROS e na expressão e atividade de enzimas antioxidantes são baseados essencialmente em estudos que utilizam altas aplicações exógenas desse aminoácido. Poucos trabalhos abordam essas funções da prolina em sistemas vegetais com elevada produção endógena (KOCZY et al., 2005; MOLINARI et al., 2007). Além disso, as espécies utilizadas naqueles trabalhos caracterizam-se por naturalmente acumularem baixas concentrações de prolina, e não em plantas com alta capacidade de produção e acumulação deste aminoácido, como por exemplo as plantas cítricas (NOLTE; HANSON, 1997).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar os níveis transcricionais de genes envolvidos na resposta enzimática para proteção ao estresse oxidativo em plantas proporcionado por condições de déficit hídrico. Para tanto, foram utilizadas plantas transgênicas de citrumeleiro cv. Swingle, espécie esta usada como porta-enxerto de citros e que apresenta alta capacidade de acumular prolina, superexpressando o gene mutante *P5CSF129*. As alterações na quantidade de transcritos de isoformas de ascorbato peroxidase, catalase, superóxido dismutase e glutatona redutase foram avaliadas por PCR em Tempo Real.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Material Vegetal

Cinco plantas do porta-enxerto citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* Macfad. Cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) contendo o gene mutante P5CS de *Vigna aconitifolia* controlado por promotor constitutivo 35S CaMV (evento CT-P5-20) foram multiplicados via enraizamento de estacas para utilização neste trabalho (MOLINARI et al., 2004). Também, cinco plantas de um clone de citrumelo Swingle não transformado obtido pelos mesmos procedimentos de cultura de tecidos usados para a produção do evento de transformação CT-P5-20 e de multiplicação por estaquia, serviram como plantas controle.

Os porta-enxertos, de quatro anos de idade, foram mantidos em vasos de plástico com 15 Kg de substrato (3 terra: 1 areia: 1 composto orgânico). Aproximadamente quatro semanas antes do início do experimento, as plantas foram podadas para que apresentassem maior uniformidade. O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) com as plantas dispostas em arranjo inteiramente casualizado.

### 5.2.2 Condições de Déficit Hídrico

As plantas foram submetidas a um período de 13 dias sem adição de água nos vasos para as plantas controle não transformadas e 16 dias para as plantas transgênicas, respectivamente, devido aos diferentes tempos necessários para as plantas atingirem o mesmo nível de estresse. Os vasos com as plantas foram dispostos em posições semelhantes em relação à incidência de radiação solar. A umidade do substrato nos vasos foi observada diariamente com o auxílio de sondas TDR (Time Domain Reflectometry) acopladas ao aparelho Tektronix 1502B Metallic TDR Cable Tester (Tektronix).

O estado da água nas folhas foi monitorado através de psicrômetros de termopar (modelo C-30, Wescor, Inc., Logan, Ut, U.S.A.) acoplados a um datalogger (Campbell Scientific, Inc., Logan, Ut, U.S.A., modelo CR-7). A cada dia de leitura, amostras de folhas totalmente expandidas de cada uma das plantas transgênicas e controle foram coletadas e inseridas nos psicrômetros. A cada dia de

leitura, entre 9h30min e 10h, discos foliares de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> foram dispostos nos psicrômetros. O datalogger foi programado para que as leituras fossem efetuadas a cada 10 min até que o equilíbrio da pressão de vapor na câmara fosse verificado. A microvoltagem fornecida pelo sistema foi convertida em potencial da água (MPa) em função de prévia calibração dos sensores com soluções de cloreto de sódio. Após a obtenção do potencial total da água ( $\Psi_t$ ), os sensores foram imersos durante 4 min em nitrogênio líquido e as leituras retomadas para obtenção do potencial osmótico ( $\Psi_s$ ). O cálculo do potencial de pressão foi realizado através de  $\Psi_t - \Psi_s$ .

### 5.2.3 Parâmetros de Coleta

Para possibilitar a análise do material a partir de condições de turgor semelhantes, os tempos de coleta foram determinados de acordo com o potencial total de água nas folhas. Estes pontos foram denominados de 'sem estresse', 'estresse moderado', 'estresse severo' e 'recuperado' e referem-se, respectivamente, às condições normais de suprimento de água ( $\Psi_t = -1,3$  MPa), estresse moderado ( $\Psi_t = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), estresse severo ( $\Psi_t = -3,8$  a  $-3,9$  MPa) e plantas re-irrigadas após atingirem o ponto de estresse severo e que tiveram suas folhas coletadas depois de 24h ( $\Psi_t = -1,3$  a  $-1,9$  MPa).

As avaliações foram feitas em folhas em estágio similar de desenvolvimento coletadas de forma aleatória na região intermediária das plantas controle e das plantas transgênicas. As repetições biológicas foram representadas por três pools de folhas das plantas controle e de folhas dos clones do evento transgênico coletadas em cada ponto de análise. Cada pool consistiu de uma folha coletada em cada um das cinco plantas. As folhas foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido após a coleta. O material foliar foi macerado em N<sub>2</sub> líquido e acondicionado em freezer -80°C até o momento das análises.

### 5.2.4 Quantificação de Prolina

A determinação do conteúdo de prolina foi feita baseada em metodologia descrita por Bates (1973), com algumas modificações. Aproximadamente 30 mg de tecido foliar provenientes de 4 pools de folhas das

plantas controles e transgênicas previamente macerados em N<sub>2</sub> líquido foram homogeneizados em 6 mL de ácido sulfossalicílico 3% (p/v). Após centrifugação (7500 rpm) por 10 min, 2 mL do extrato foram coletados e adicionados a 2 mL de solução ácida de ninhidrina (1,25 g de ninhidrina; 30 mL de ácido acético glacial; 20 mL de ácido fosfórico 6M) e 2 mL de ácido acético glacial, em tubos de microcentrífuga de 15 mL. As amostras foram incubadas a 100°C por 1 h e em seguida colocadas em gelo para finalizar a reação. À solução foram adicionados 4 mL de tolueno, seguindo de agitação por 20 s para a completa extração da prolina. O sobrenadante foi utilizado para a leitura em espectrofotômetro a 520 nm e as absorbâncias comparadas à curva-padrão de prolina (0 a 100 µg. mL<sup>-1</sup>). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos expressos em µmol de prolina por grama de massa fresca (µmol. g MS<sup>-1</sup>).

#### 5.2.5 Determinação do Conteúdo de Malondialdeído (MDA)

O malondialdeído, um produto secundário da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, atua como um indicativo de peroxidação lipídica. A metodologia utilizada para a quantificação de MDA baseou-se em protocolo descrito por Heath; Packer (1968). Cerca de 100 mg de tecido foliar macerado foi homogeneizado em 6,5 mL de etanol 80% (v/v) e em seguida a solução foi centrifugada a 5200 rpm por 10 min. Desse extrato foi coletado 1 mL e transferido para outro tubo de microcentrífuga de 15 mL contendo 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,65% (p/v) em ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v). As amostras foram incubadas a 95°C durante 25 min, transferidas para o gelo e centrifugadas novamente para realizar leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 532 nm e 600 nm.

Os equivalentes de MDA foram calculados através da seguinte expressão <Equivalentes MDA= [(A532-A600) / 155000] x 10<sup>6</sup>>, onde A532 indica a absorbância máxima do complexo MDA-TBA a 532 nm, A600 é a absorbância a 600 nm, que corrige interferentes não-específicos e 155000 é o coeficiente de extinção molar para o MDA. O ensaio foi realizado em triplicata e os valores expressos em nanomol de MDA por grama de massa fresca (nmol.g MF<sup>-1</sup>).

### 5.2.6 Busca e Análise de Seqüências ESTs de Enzimas Antioxidantes e Desenho de Primers

A partir do banco de dados HarvEST Citrus versão 1.2 ([www.http://harvest.ucr.edu/](http://harvest.ucr.edu/)) com a utilização da opção Assembly C46 foram realizadas buscas de reads (seqüências) referentes aos genes que codificam para as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutational redutase (GR) e suas isoformas, a *P5C sintetase (P5CS)* nativa e o gene de referência para normalização fator de alongamento 1  $\alpha$  (*EF1 $\alpha$* ). Este Assembly é resultado de 229.570 ESTs de Citrus e Poncirus provenientes de 89 bibliotecas de cDNA de diferentes tecidos e condições/estádios de desenvolvimento.

Os reads obtidos foram agrupados com a utilização do software Vector NTI 10.3 (Invitrogen) e os contigs resultantes foram confrontados com as seqüências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando BlastX. As isoformas foram selecionadas baseando-se no maior número de reads obtidos e também na sua presença em bibliotecas de cDNA de plantas estressadas, informações estas também obtidas na plataforma HarvEST Citrus.

A predição da localização subcelular foi realizada com a utilização do software WoLF PSORT ([wolfpsort.seq.cbrc.jp](http://wolfpsort.seq.cbrc.jp)). Também, foram realizadas análises filogenéticas de cada um dos genes estudados para confirmar a similaridade com genes de enzimas antioxidantes de outros organismos. O dendrograma foi gerado com a utilização do programa CLC Combined Main Workbench, método UPGMA e o teste de confiabilidade Bootstrap (1000 replicações).

As seqüências dos genes das enzimas antioxidantes e suas isoformas foram alinhadas, as ORFs identificadas e as regiões de maior dissimilaridade analisadas através do software CLC Main Workbench para que a construção dos *primers* fosse feita com sequencias específicas para cada isoforma, com prioridade para a região 3'-UTR. Para o desenho dos *primers* foi utilizado o software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) de modo que o amplicon obtido fosse de 80 pares de bases. Os amplicons para cada gene e suas isoformas foram confrontados com as seqüências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmar especificidade (Tabela 2).

**Tabela 2** – Primers utilizados nas ampliações dos genes que codificam as enzimas antioxidantes, do *P5CS* nativo e do mutante *P5CSF129A* de *V. aconitifolia*

Gene	Primer senso - 5→3'	Primer reverso - 5→3'	Unigene	# GenBank	ESTs mais representativos
<i>APX1</i>	AGAAGAAGCTGCGCTCCACTCA	ACCTCCGGTCTTGGTCTTCA	UC46_1046	AU300676	1046, 1057, 1058,
<i>APX2</i>	CAGTGGAGAAATGCAAGAGGAA	CCATGCCAAGCGAAGAATG	UC46_1741	CV719768	1741
<i>APXCL</i> (cloroplasto)	TGCACACACAGTGGGAAGGT	CTGGTCCATCTTTCGTGTACTTTG	UC46_3817	DY285152	3817
<i>CAT1</i>	GCCAAGCATTGAAGGTGTCA	TGGTGTTCACTCCTTGCTCACT	UC46_1136	CK934012	1124, 1126, 1136
<i>CAT2</i>	GCTTCCCTCCCGCTATGG	GCCGGAATTGGTGGTAAAGA	UC46_1119	DN622882	1119
<i>CuZnSOD1</i>	CCTCTCTCTAAGGGCGTTGTGA	TTGCGACCGTTAGTTCAGTAA	UC46_7657	CX672920	7657, 39863, 39963
<i>CuZnSOD2</i>	CCTGCTGGAAAAGAACATGGA	TCATCACCAACATTGACATTTCT	UC46_988	CN182884	988
<i>CuZnSODL</i> (cloroplasto)	CTCAATGCAAGCCGCAATAG	CAAGGAGTGTGTGCGATGAAGA	UC46_7636	DY278866	7636, 7637
<i>FeSOD</i>	TGTGGCTAATGCGGTGAATC	GATTGACAGCATTGGGAGTCTTC	UC46_2835	CF507548	2835, 2836, 2837
<i>MnSOD</i>	TGTATCAGAAAGAATGCCCTTAAGC	CCCAAGAGAGAACCCAGATCAA	UC46_2839	CF831596	2838, 2839
<i>GR</i>	AGCATCAATGTGTGGGCCA	CTGTCAAATTGTGCCTTCGTAGC	UC46_5630	CB290837	5629, 5630
<i>GRL</i> (cloroplasto)	TTTGCACATGTGTGGAGAAGATG	CATCAAAGTCTGCCTTAGTGAGACC	UC46_4092	CV705447	4092
<i>P5CS</i> (nativo)	GTGCGTGCTGCTATTGACCAT	GCAACTTTTTGATCTTCTGCAACA	UC46_460	DN624012	460, 608, 845
<i>P5CSF129A</i> (transgene)	CAACATGCGAATCATTGCCA	AATTAGCCCATCTGAAAGCTCG	—————	M92276	—————

### 5.2.7 Extração de RNA

O RNA total das folhas foi extraído pelo método Chang (1993) com algumas modificações. Aproximadamente 1g de tecido foliar previamente macerado em N2 líquido foram homogeneizados em 20 mL de tampão CTAB contendo 400µL de β-mercaptoetanol. Após a homogeneização os tubos foram colocados em banho-maria a 65 °C por 20 min. A solução foi então centrifugada a 7500 rpm por 5 min e o sobrenadante vertido em um novo tubo. Foi adicionado 1 vol. de clorofórmio e feita a homogeneização e centrifugação a 7500 rpm por 5 min. A fase superior foi recolhida e fase de clorofórmio feita novamente. Em seguida, adicionou-se cloreto de lítio de modo que no tubo a concentração fosse 2,5 M sendo que a fase de precipitação foi feita *overnight* a 4 °C.

A solução foi centrifugada a 7500 rpm por 30 min a 4 °C, o sobrenadante descartado e o pellet lavado com cloreto de lítio 2,5 M. Posteriormente foi feita uma centrifugação nas mesmas condições por 5 min. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* ressuspendido em 1mL de tampão DNase contendo 0,5 µL de RNase OUT. Incubou-se por 1 h a 37 °C e em seguida foi adicionado 1 vol. de fenol/ clorofórmio. Novamente fez-se a centrifugação para a retirada da fase superior que foi acrescida de 1 vol. de clorofórmio seguido de centrifugação. A fase superior resultante foi retirada e acrescentou-se 0,3 vol. de acetato de sódio e 3 vezes o vol. de etanol 100%.

A precipitação foi feita *overnight* a -20 °C. Posteriormente centrifugou-se a 7500 rpm por 30 min a 4 °C, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi lavado com etanol 70%. Foi feita então uma centrifugação a 1100 rpm por 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o pellet secado antes de ressuspender em 30 µL de água DEPC (0,1%).

As amostras de RNA foram purificadas com a utilização do Kit Pure Link Micro to Midi Total RNA Purification System (Invitrogen) e em seguida foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), utilizando tampão TAE 1x (2M Tris – acetato, 0,05 M EDTA) para verificar a qualidade e integridade das amostras. O RNA extraído foi quantificado pelo método espectrofotométrico a 260nm e a pureza foi avaliada em um comprimento de onda de 260nm/280nm (Spectronic Unicam

Genesys™). Para confirmação, a quantificação foi feita também através do kit quant-iT™ RNA Assay 5-100 ng (Qubit® fluorometer - Invitrogen).

As amostras foram tratadas com DNase-RNase free para eliminar contaminação com DNA e a integridade do RNA purificado foi confirmada por eletroforese desnaturante em gel de agarose. Subunidades 28S e 18S de RNAr foram observadas no gel indicando a integridade do RNA. Também, as amostras de RNA foram usadas para amplificação por PCR com *primers* do gene GAPDH e, em seguida, submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) com tampão TAE, contendo brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e visualizados sob luz UV para verificar presença de bandas.

#### 5.2.8 Teste de Eficiência de Primers

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen) partindo de  $5\mu\text{g}$  de RNA total extraído das folhas. Este cDNA foi submetido a uma reação de PCR, com os *primers* específicos de cada gene (Tabela 2), de acordo com as seguintes condições:  $94^{\circ}\text{C}$  5 min,  $94^{\circ}\text{C}$  1 min,  $60^{\circ}\text{C}$  1 min,  $72^{\circ}\text{C}$  2 min, ciclo repetido 40 vezes,  $72^{\circ}\text{C}$  5 min. A eletroforese dos produtos de PCR foi feita em gel de agarose 1% (p/v) com tampão SB (NaOH 10mM pH 8,5) para verificar se os *primers* estavam amplificando somente a região de interesse de 80 pares de bases.

As diluições para o cálculo de eficiência de *primers* partiram de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de RNA total presentes em  $30\mu\text{L}$  de água DEPC até se atingir a concentração  $10^{-3}$ . A curva obtida plotando-se os valores de Ct em função do logaritmo das diluições forneceu um valor de *slope* que foi aplicado na fórmula  $E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1]$ . Os parâmetros de ciclagem utilizados para as reações foram:  $50^{\circ}\text{C}$  3 min,  $95^{\circ}\text{C}$  5 min, 40 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  15 seg e  $60^{\circ}\text{C}$  30 seg,  $40^{\circ}\text{C}$  1 min. As curvas de dissociação foram analisadas para cada par de primer visando verificar a presença de somente um pico gene-específico e ausência de “primer dimers”.

### 5.2.9 PCR em Tempo Real

Os perfis transcricionais dos genes da ascorbato peroxidase (isoformas *APX1*, *APX2* e *APX* cloroplasto), catalase (*CAT1* e *CAT2*) *superóxido dismutase* (*Cu/Zn-SOD1*, *Cu/Zn-SOD2* e *Cu/Zn-SOD* cloroplasto, *Fe-SOD* cloroplasto e *Mn-SOD* mitocondrial, glutationa redutase (*GR* citosólico e *GR* cloroplasto), *P5CS* nativo e *P5CSF129A* transgene (*Vigna aconitifolia*) (Tabela 2) foram detectados por PCR quantitativo em Tempo Real (modelo 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystem) utilizando o kit Superscript<sup>TM</sup> III Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green One-Step qRT-PCR, conforme recomendação do fabricante, com um volume final de reação de 25µL.

Para cada amostra, as reações foram montadas na placa em duplicata (Hellemans et al., 2007) para cada uma das três repetições biológicas representadas pelos pools de folhas coletados nos diferentes tratamentos de déficit hídrico e após a recuperação das plantas. A expressão relativa dos genes foi calculada com a utilização do método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Em todas as análises, os níveis de transcrição dos genes alvo foram normalizados contra o perfil transcricional do gene do fator de alongamento 1  $\alpha$  (*EF1 $\alpha$* ), já que o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  exige a utilização de somente um housekeeping (ver artigo anterior). O tratamento calibrador utilizado foi a condição normal de suprimento de água das plantas controle. Para avaliar o nível de transcrição do *P5CSF129A* (transgene) foi utilizada a condição normal de suprimento de água das plantas transgênicas como calibrador.

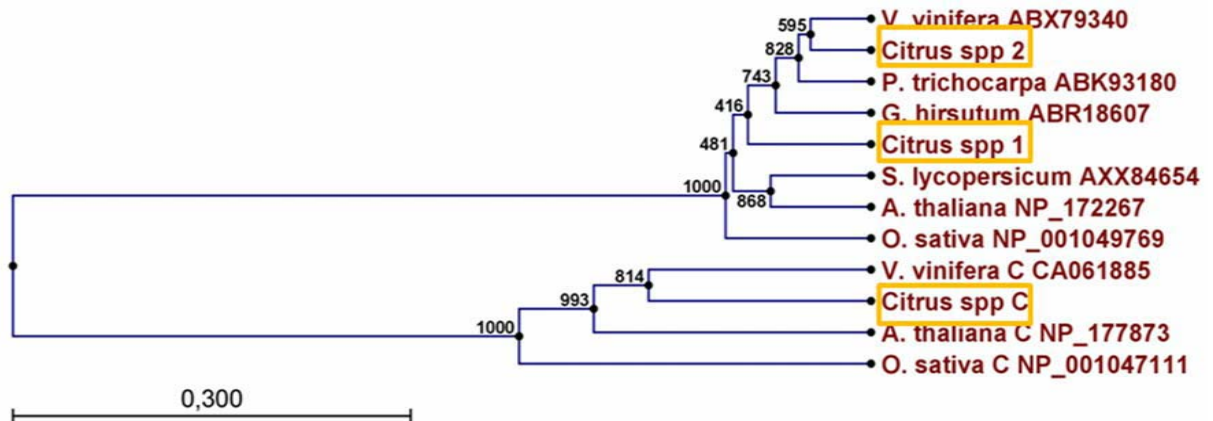
Ao final de cada corrida de PCR, uma curva de dissociação foi gerada para verificar amplificações inespecíficas (ver curvas em anexo).

## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Dendrogramas de Similaridade

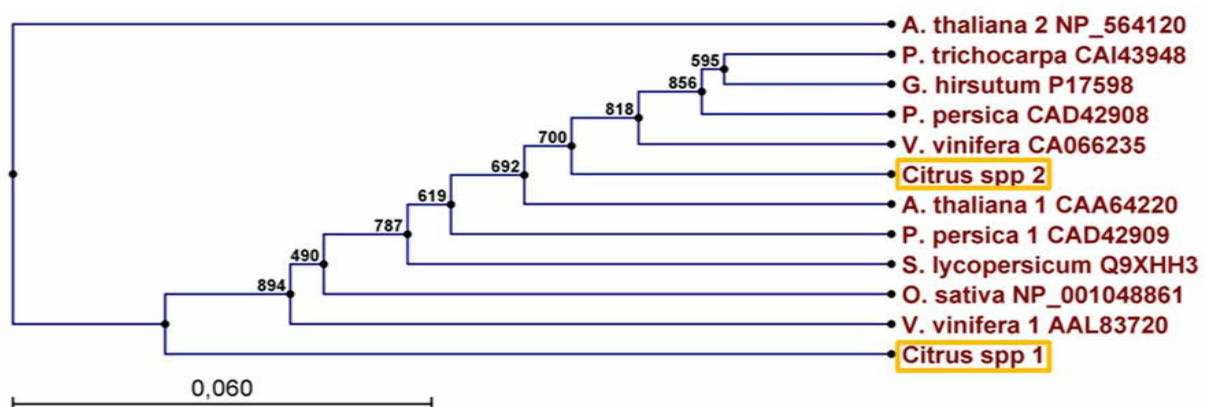
Para verificar a similaridade entre as isoformas dos genes *APX*, *CAT*, *SOD* e *GR* com genes de outras plantas, foram construídas árvores de similaridade. Foi possível verificar que no caso da *APX* houve a formação de dois grupos distintos (Figura 9). Em um primeiro grupo foram agrupadas as *APX*

citossólicas 1 e 2 (*Citrus* spp. 1 e 2) e no segundo grupo estão as APX de cloroplasto. A isoforma APX1 de *Citrus* spp. apresenta maior similaridade com a APX de *Gossypium hirsutum* enquanto que a isoforma 2 e a cloroplasto estão mais próximas da APX de *Vitis vinifera*.



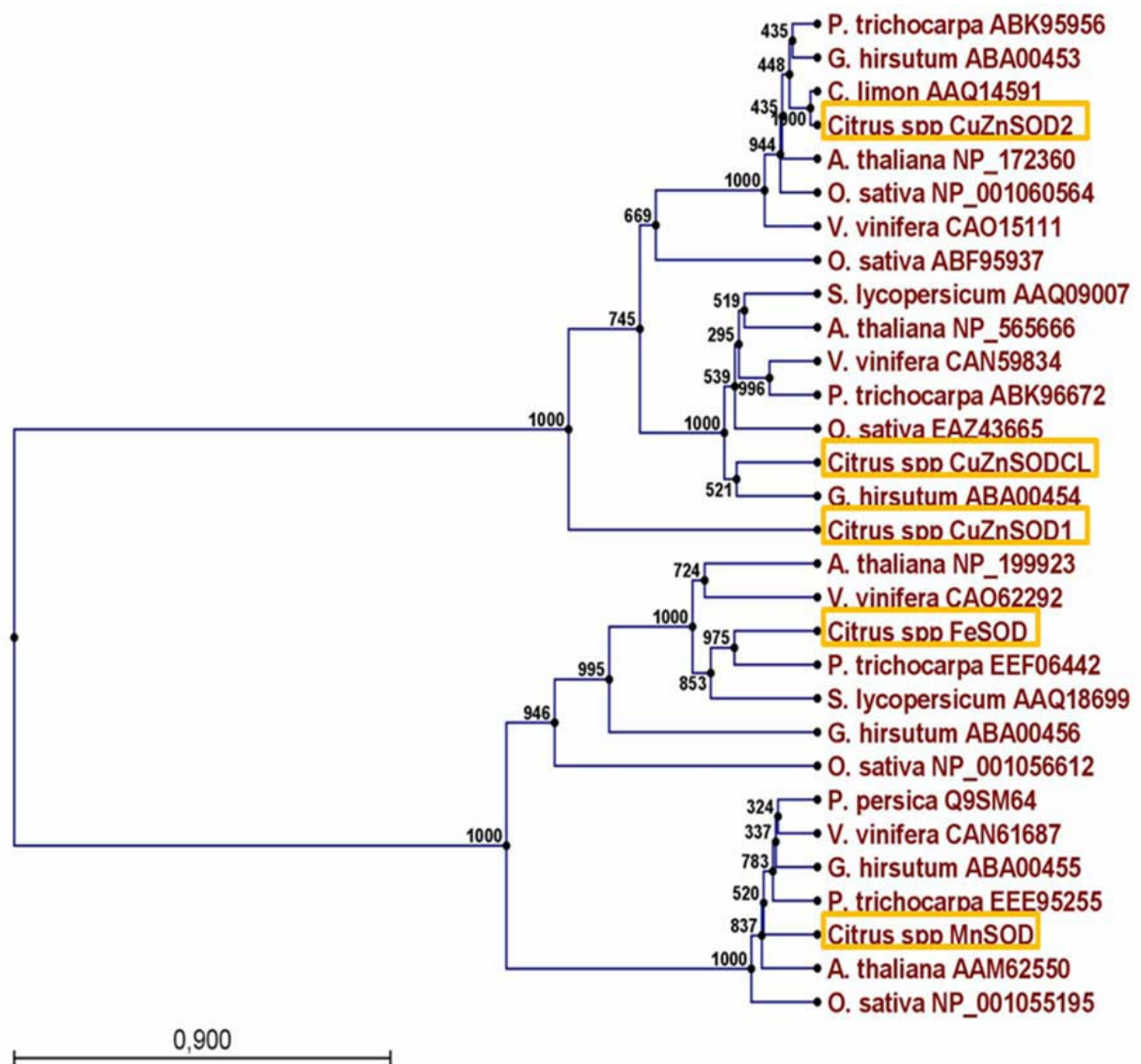
**Figura 9** – Dendrograma de similaridade de genes de três isoformas da enzima ascorbato peroxidase (APX1, APX2 e APX cloroplasto) de *Citrus* spp. com APXs de *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa*, *Gossypium hirsutum*, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* e *Oryza sativa*.

Já na análise dos genes de diferentes catalases (Figura 10), não foi possível visualizar a separação em grupos bem definidos indicando que as duas isoformas (representadas por *Citrus* 1 e 2) estão relacionadas, já que ambas são de peroxissomos, conforme análise pelo programa WoLF PSORT. Ambas isoformas mostraram-se mais similar aos seus ortólogos de *V. vinifera*.



**Figura 10** – Dendrograma de similaridade de genes de duas isoformas da enzima catalase (CAT1 e CAT2) de *Citrus* spp. com genes de CAT de *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa*, *Gossypium hirsutum*, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *Oryza sativa* e *Prunus persica*.

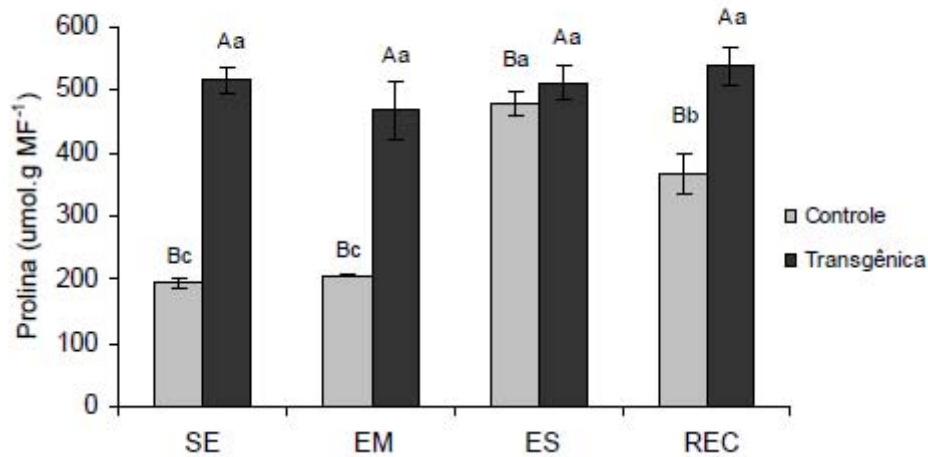
A árvore de similaridade para as isoformas de SOD também evidenciou separações definidas entre as isoformas. Neste caso destacaram-se dois grandes grupos, onde no primeiro estão agrupadas as isoformas *CuZnSOD2* e *CuZnSODCL*, sendo que a isoforma *CuZnSOD1* ficou em um ramos isolado. Ainda, a isoforma citosólica *CuZnSOD2* se mostrou bastante similar a seu ortólogo de *C. limon*. Em um segundo grupo, estão as isoformas *FeSOD* (cloroplasto) e *MnSOD* (mitocôndria) que se separam em grupos distintos. A *FeSOD* foi mais similar a *FeSOD* de *P. trichocarpa* e a isoforma *MnSOD* se apresentou mais próxima de *A. thaliana* (Figura 11).



**Figura 11** – Dendrograma de similaridade de genes de cinco isoformas da enzima superóxido dismutase de *Citrus spp.* com genes de SOD de *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa*, *Citrus limon*, *Gossypium hirsutum*, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *Oryza sativa* e *Prunus persica*.



alteraram significativamente a quantidade de prolina nas folhas durante o estresse severo e recuperação.



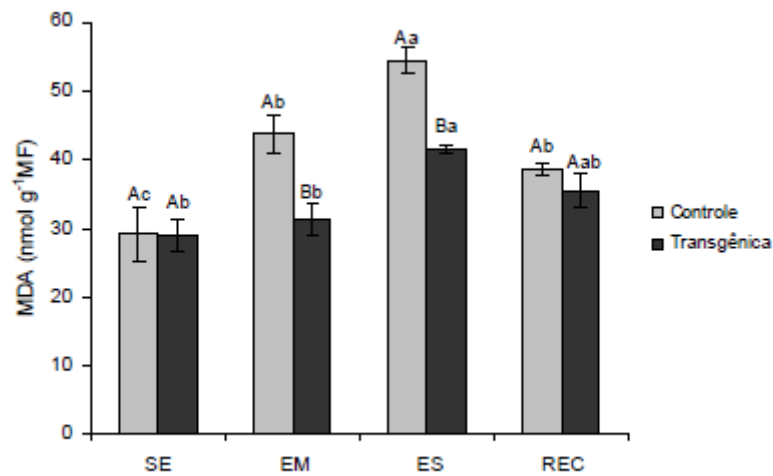
**Figura 13** – Conteúdo de prolina livre em folhas de plantas controle não-transformadas e de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão ( $n=4$ ). Letras maiúsculas comparam colunas de padrões diferentes e letras minúsculas comparam colunas de mesmo padrão. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

### 5.3.3 Conteúdo de Malondialdeído (MDA)

Os mesmos níveis de MDA foram obtidos em folhas de ambas as plantas na condição irrigada. Com a imposição do estresse houve aumento significativo de MDA em plantas controle, que atingiram uma quantidade cerca de duas vezes maior no estresse hídrico severo, em comparação à condição normal de suprimento de água (Figura 14). Durante a recuperação, essas plantas apresentaram queda nos níveis de MDA, com valores similares à condição de estresse moderado.

A peroxidação lipídica foi observada em plantas transgênicas somente a partir do estresse hídrico severo, porém com níveis de MDA atingindo cerca de 1,5 vezes mais do que na condição irrigada. Durante o estresse severo, houve diferença significativa entre essas plantas e as controle não-transformadas, que apresentaram acúmulo 1,3 vezes maior quando comparadas às transgênicas com alto acúmulo de prolina. Houve ligeira queda na quantidade de MDA em plantas

transgênicas no período de recuperação, sendo que estas apresentaram valores similares aos das plantas controle não-transformadas (Figura 14).

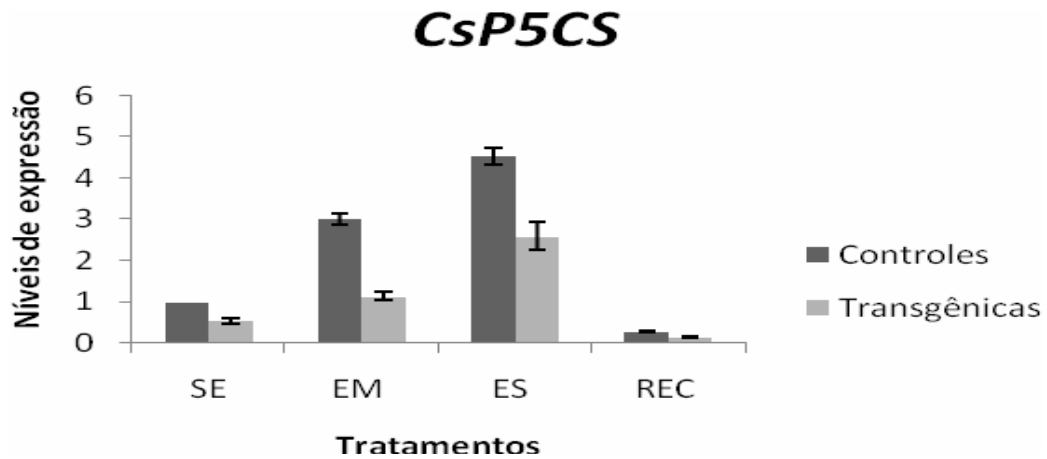


**Figura 14** – Conteúdo de MDA em folhas de plantas controle não-transformadas e de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão ( $n=4$ ). Letras maiúsculas comparam colunas de padrões diferentes e letras minúsculas comparam colunas de mesmo padrão. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

### 5.3.4 PCR em Tempo Real

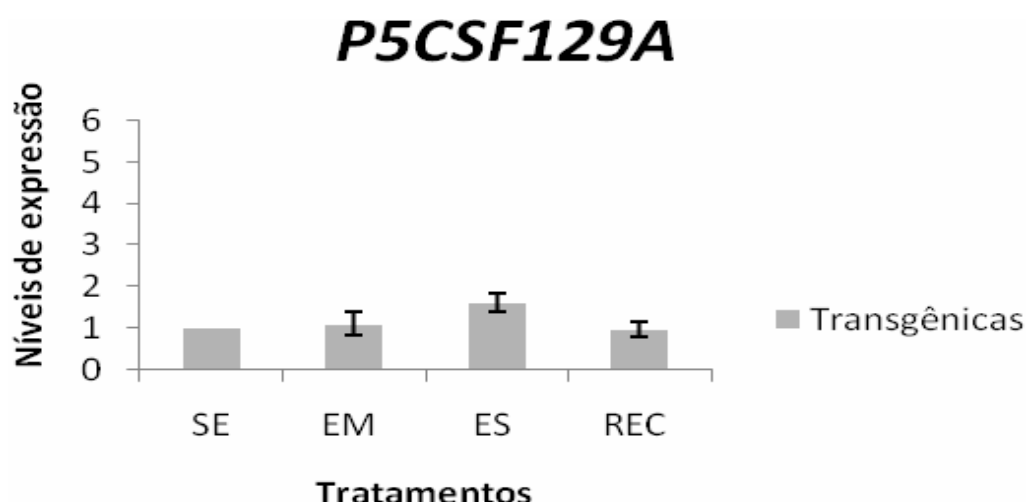
#### 5.3.4.1 *P5CS* nativo e o transgene *P5CSF129A*

Os resultados obtidos com as análises dos genes *P5CS* nativo e transgene evidenciaram que, no caso do *P5CS* nativo em plantas controle, houve um aumento acentuado no nível de transcritos durante o estresse moderado e severo com elevada repressão durante a recuperação (Figura 15). O gene *P5CS* nativo em plantas transgênicas contendo adicionalmente o gene *P5CS* mutante de *V. aconitifolia*, se comportou da mesma forma; entretanto, o nível de expressão deste gene nestas plantas foi aproximadamente a metade do observado em plantas controle tanto em condições normais de suprimento de água quanto nos dois níveis de deficiência hídrica. Similarmente ao *P5CS* nativo, a expressão do gene mutante *P5CSF129A* foi reprimida após 24 h da reidratação.



**Figura 15** – Níveis de transcrição do P5CS nativo (*CsP5CS*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ ).

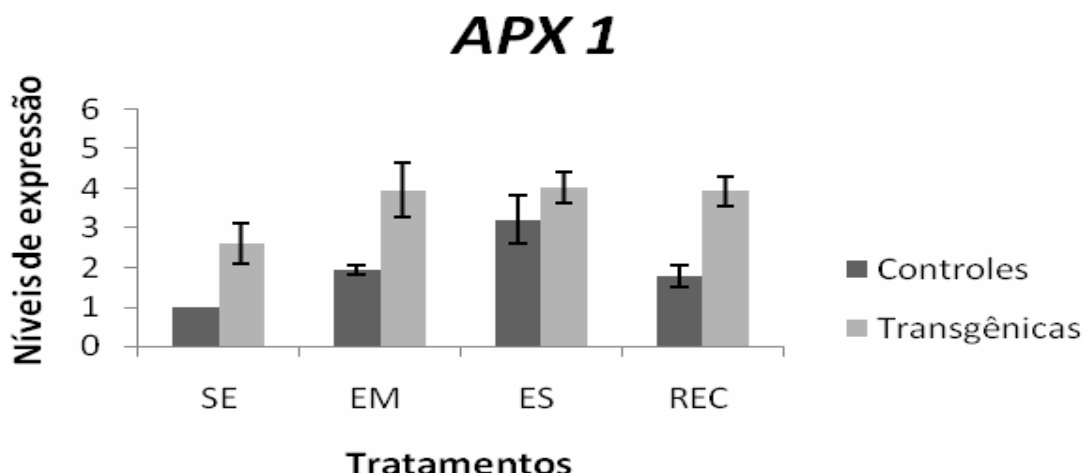
A avaliação da transcrição do transgene *P5CS129A* nas plantas transgênicas mostrou que o nível de transcritos foi bastante similar em todos os tratamentos analisados (Figura 16). Esta observação demonstra a estabilidade do promotor 35S CaMV durante o estresse hídrico, dando suporte à similaridade da concentração de prolina detectadas nas folhas de plantas transgênicas de citrumeleiro tanto em condições normais de irrigação como em todos os tratamento após o início do estresse (Figura 13).



**Figura 16** – Níveis de transcrição do *P5CS* transgene (*P5CSF129A*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão. O calibrador utilizado neste caso foi o tratamento sem estresse de plantas transgênicas ( $n=3$ ).

### 5.3.4.2 Ascorbato peroxidase

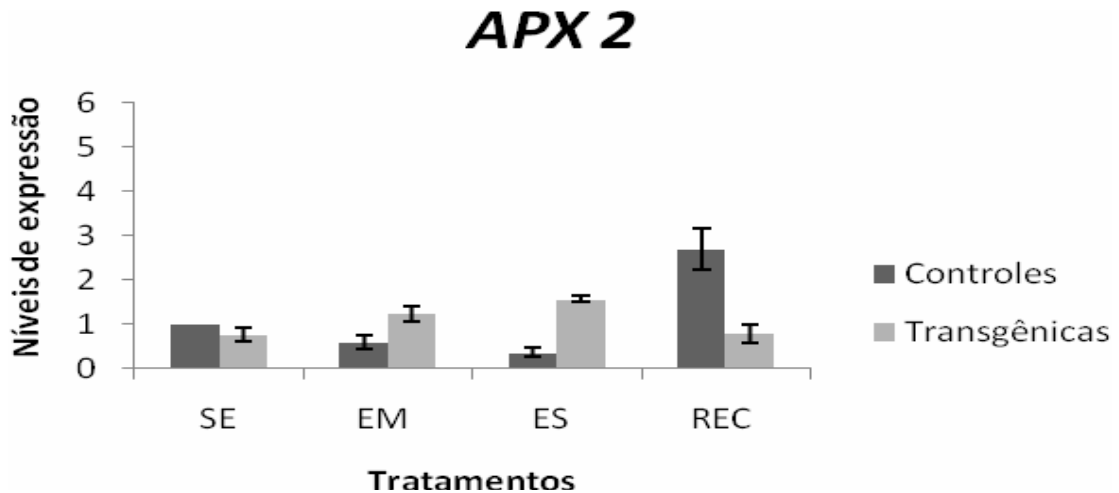
A expressão de RNAm da isoforma *APX1* em plantas controle e transgênicas foi bastante alterada em função da quantidade de prolina nas folhas de citrumeleiro (Figura 17). Em condições normais de suprimento de água, plantas superexpressando o transgene *P5CSF129A* já demonstravam valores de transcrição maiores aos apresentados por plantas não transformadas. Durante a submissão ao déficit hídrico, as plantas transgênicas demonstraram maiores níveis de transcrição da isoforma *APX1* do que as plantas controle. O perfil de expressão apresentado pelas plantas transgênicas indica que houve um aumento de expressão com o início do estresse e manutenção destes níveis até o período de recuperação. Plantas controle aumentaram a expressão durante o estresse, porém sempre em nível inferior ao das plantas transgênicas. Durante a recuperação a transcrição desta isoforma foi reduzida (Figura 17).



**Figura 17** – Níveis de transcrição da ascorbato peroxidase 1 (*APX1*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ ).

Plantas transgênicas de citrumeleiro em condições normais de suprimento de água apresentaram níveis de expressão da isoforma *APX2* praticamente igual aos observados nas plantas controle (Figura 18). Contudo, durante a submissão aos diferentes níveis de estresse a expressão foi levemente elevada com posterior redução 24 horas após a irrigação a níveis similares aos apresentados antes do estresse. As plantas controle, ao contrário das transgênicas,

reduziram a levemente a transcrição da isoforma *APX2* durante o estresse moderado e severo. Já durante a recuperação os níveis de expressão foram bastante elevados, bem maiores inclusive que nas plantas transgênicas (Figura 18).

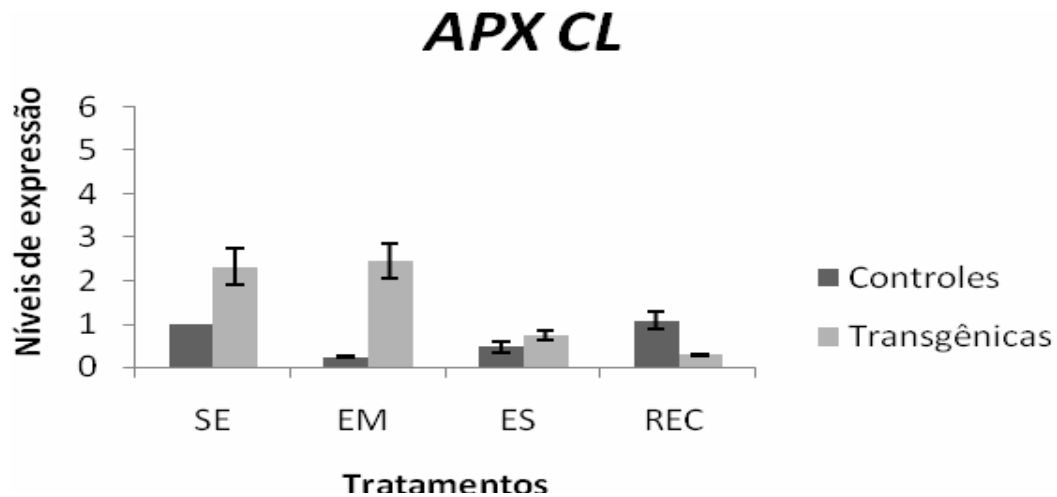


**Figura 18** – Níveis de transcrição da ascorbato peroxidase 2 (*APX2*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão (n=3).

No caso da *APX cloroplasto (APXCL)*, os dados obtidos mostram o grande efeito da prolina na indução desta isoforma. Em condições normais as plantas transgênicas acumularam 1,5 vezes mais transcritos desta isoforma do que as plantas controle. Durante o estresse moderado esta transcrição se manteve com posterior redução durante o estresse severo e recuperação. Em contraste, as plantas controle diminuíram a transcrição com o início do estresse. Porém, esta expressão aumentou durante o estresse severo e na recuperação (Figura 19).

Quando as três isoformas foram contrastadas, verificou-se que a isoforma 1 da ascorbato peroxidase mostrou maior aumento de transcrição em relação a plantas controle irrigadas durante o período de estresse moderado, severo e 24 horas após a irrigação, tanto em plantas controle quanto em transgênicas. Com exceção da fase de recuperação no caso da *APX2* e *APXCL*, a alta concentração de prolina livre nas folhas causada pela expressão constitutiva do transgene *P5CSF129A* parece influenciar positivamente o nível transcricional das APXs analisadas. Além disso, plantas transgênicas em condições normais de suprimento de água possuem transcrição dos genes *APX1* e *APXCL* mais elevada que em

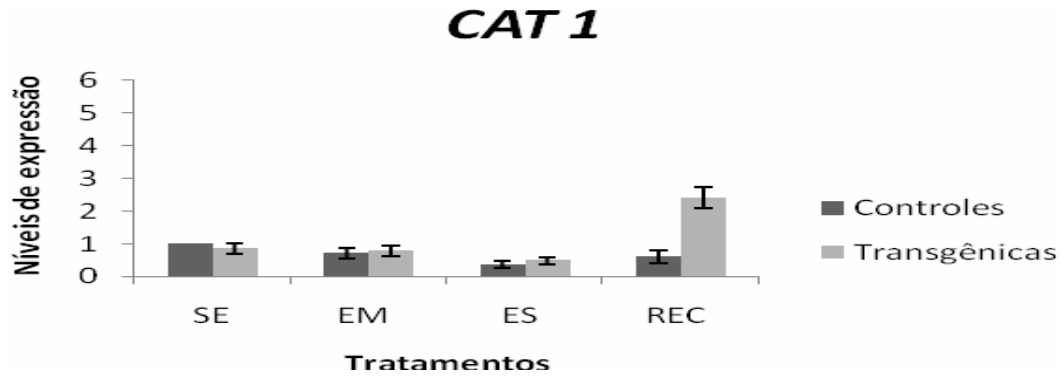
plantas controle (Figuras 17 e 19), indicando a influência de altos níveis de prolina na regulação destas duas isoformas.



**Figura 19** – Níveis de transcrição da ascorbato peroxidase cloroplasto (*APXCL*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ ).

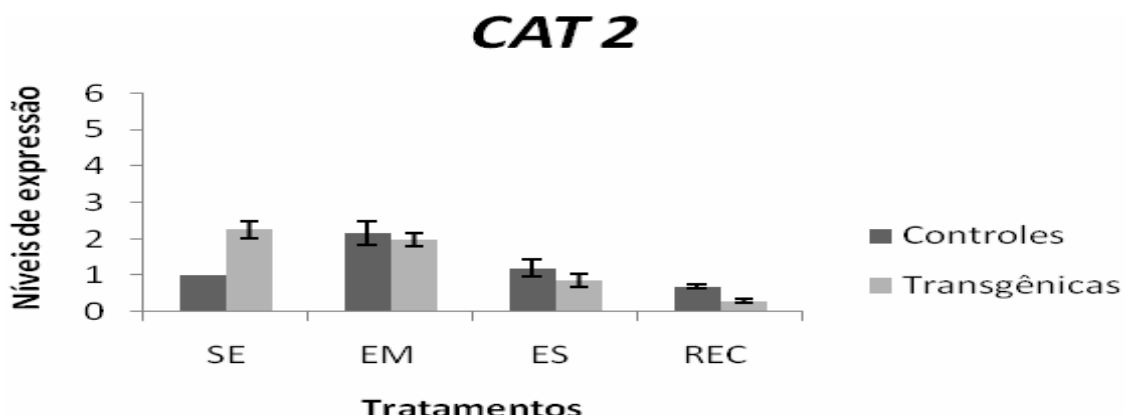
#### 5.3.4.3 Catalase

A grande diferença de concentração de prolina livre nas folhas entre as plantas transgênicas e plantas controle não influenciou a atividade transcricional da isoforma *CAT1* tanto em condições normais de suprimento de água como nos dois níveis de estresses hídricos aplicados (Figura 20). Sob condições de estresse moderado e severo, tanto as plantas com o transgene quanto as plantas controle apresentaram expressão da *CAT1* abaixo da atividade transcricional observada em condições normais de suprimento de água. A maior diferença da expressão desta isoforma foi observada durante a recuperação, quando as plantas transgênicas demonstraram quase 3 vezes mais transcritos deste gene do que as plantas controle (Figura 20).



**Figura 20** – Níveis de transcrição da catalase isoforma 1 (*CAT1*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ ).

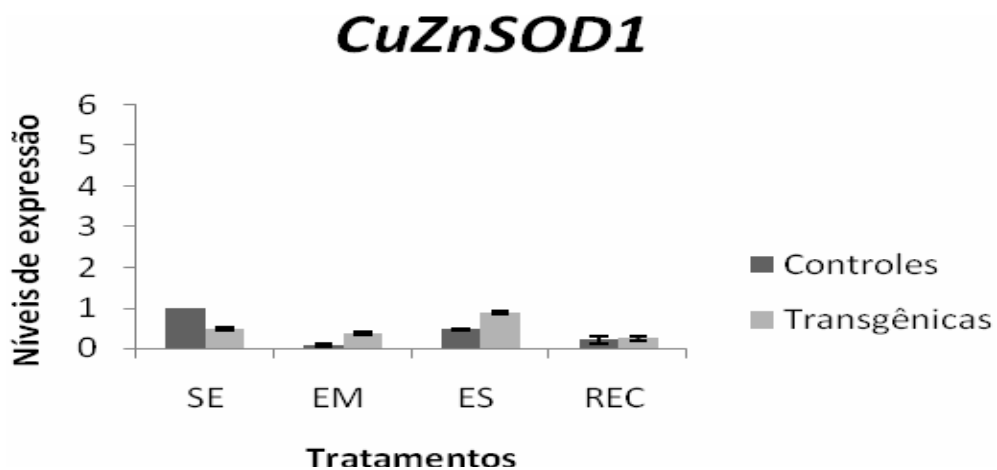
Em condições normais de suprimento de água plantas transgênicas expressaram mais o RNAm da isoforma *CAT2* do que as plantas controle, mostrando que altos níveis de prolina induziram a expressão desta isoforma de catalase. A quantidade de transcritos em plantas controle e transgênicas da *CAT2* se apresentaram próximos no período de estresse moderado. Durante o estresse severo e recuperação as plantas reduziram sua expressão, porém plantas controle apresentaram níveis levemente maiores (Figura 21). Desta forma, a quantidade de prolina nas folhas parece influenciar diferencialmente a transcrição das duas isoformas. Enquanto a *CAT1* foi mais transcrita durante a recuperação das plantas transgênicas de citrumeleiro, a expressão da *CAT2* é reprimida após o estresse hídrico em ambos os tipos de plantas.



**Figura 21** – Níveis de transcrição da catalase isoforma 2 (*CAT2*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ ).

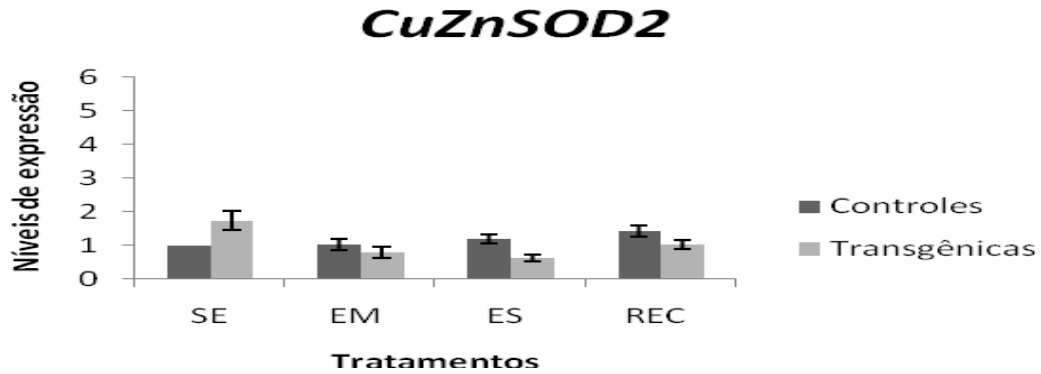
#### 5.3.4.4 Superóxido dismutase

Anteriormente ao estresse hídrico aplicado, plantas transgênicas com alto acúmulo de prolina demonstraram níveis de *CuZnSOD1* inferiores aos apresentados pelas plantas não transformadas. Esta isoforma foi reprimida durante o experimento de estresse hídrico, tanto nas plantas controle como nas transgênicas com altos níveis de prolina livre nas folhas comparativamente ao calibrador (plantas controle em condições normais de suprimento de água - Figura 22). Ainda assim, durante o estresse moderado e severo os níveis de expressão nas plantas transgênicas ultrapassou os controles não transformados. Durante a recuperação, 24 horas após a irrigação, ambas as plantas apresentaram os valores mais baixos aos apresentados antes do início do estresse (Figura 22).



**Figura 22** – Níveis de transcrição da cobre-zinco superóxido dismutase isoforma 1 (*CuZnSOD1*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão (n=3).

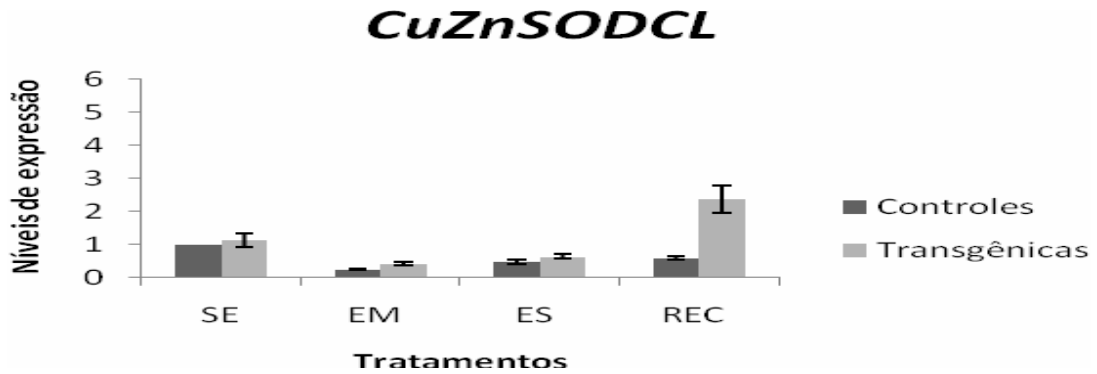
No caso da isoforma *CuZnSOD2*, embora em condições normais de suprimento de água as plantas transgênicas com o gene *P5CSF129A* tenham apresentado maior expressão, houve uma queda durante a aplicação do déficit hídrico e após a reidratação. Por outro lado, em todas as amostras a variação no nível de expressão das plantas controle não teve uma amplitude grande como em plantas transgênicas, apresentando somente uma pequena elevação durante a recuperação (Figura 23).



**Figura 23** – Níveis de transcrição da cobre-zinco superóxido dismutase isoforma 2 (*CuZnSOD2*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão (n=3).

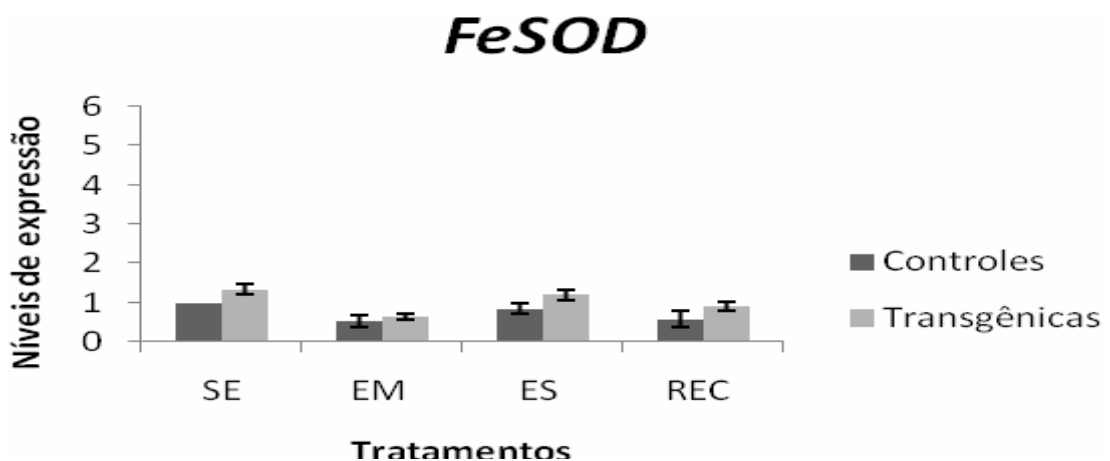
A isoforma da cobre-zinco superóxido dismutase de cloroplasto (*CuZnSODCL*) apresentou níveis de expressão mais discrepantes entre plantas controle e transgênicas 24 horas após a reidratação (Figura 24). Antes do início do estresse os transcritos de ambas as plantas possuíam níveis semelhantes. No período de estresse moderado e severo a expressão foi reduzida com as plantas transgênicas apresentando um nível levemente superior quando comparadas com as controle (Figura 24).

A transcrição das duas isoformas citosólicas, *CuZnSOD1* e *CuZnSOD2*, foram relativamente pouco afetadas pela concentração de prolina nas folhas. Quando as três isoformas de CuZnSOD são comparadas, verificou-se que a prolina parece ter um efeito maior na expressão da *CuZnSOD2* em condições não estressantes e da *CuZnSODCL* durante o processo de recuperação da planta após déficit hídrico, sendo que a sua atividade transcricional foi reprimida durante estresse.



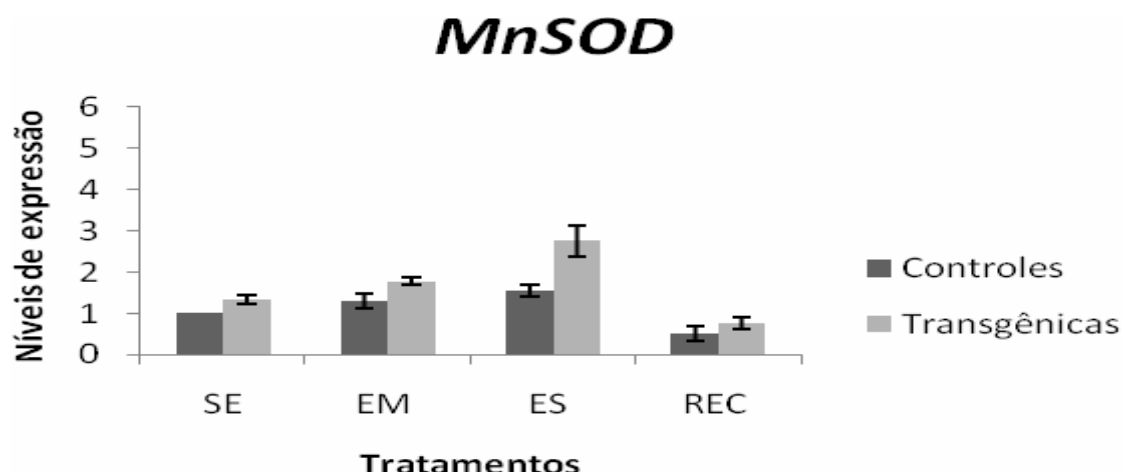
**Figura 24** – Níveis de transcrição da cobre-zinco superóxido dismutase cloroplasto (*CuZnSODCL*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão (n=3).

Apesar de somente pouco superiores do que o calibrador (plantas não transformadas com suprimento normal de água), a isoforma do gene *FeSOD* apresentou níveis de transcritos maiores em plantas transgênicas antes do início do estresse. Durante o estresse moderado a transcrição deste gene nos dois tipos de plantas foi similarmente reprimida e durante o estresse severo plantas as transgênicas apresentaram expressão levemente superior, mostrando a pouca influencia da prolina na expressão deste gene. Mesmo durante a recuperação os níveis de transcritos observados foram praticamente iguais nas duas plantas (Figura 25).



**Figura 25** – Níveis de transcrição da ferro superóxido dismutase (*FeSOD*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão (n=3).

No caso da *MnSOD*, enzima localizada na mitocôndria, as plantas transgênicas apresentaram maiores níveis de expressão em todos os tratamentos. Tanto o estresse hídrico moderado quanto o severo induziram o aumento da expressão da isoforma *MnSOD* em ambos os tipos de plantas, sendo que houve uma repressão acentuada após a reidratação das plantas (Figura 26). A diferença mais visível entre plantas controle e transgênicas foi detectada durante o período de estresse severo, apesar dessas plantas terem alcançado níveis de prolina semelhantes nas folhas (Figura 13).



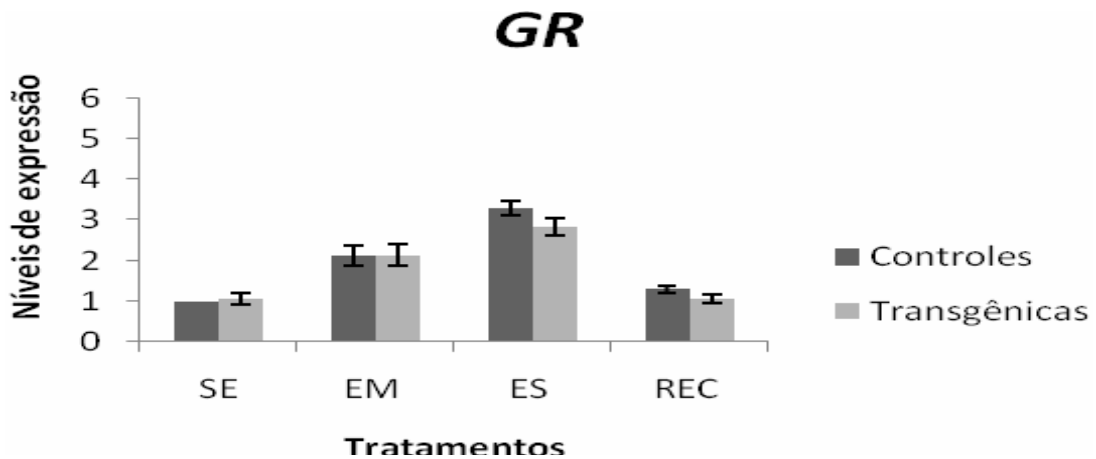
**Figura 26** – Níveis de transcrição da manganês superóxido dismutase (*MnSOD*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ ).

Quando todas as isoformas de superóxido dismutases são comparadas, é possível observar que a indução da transcrição da *MnSOD* mitocondrial é maior em comparação com as outras localizadas nos cloroplastos e no citosol.

#### 5.3.4.5 Glutathiona redutase

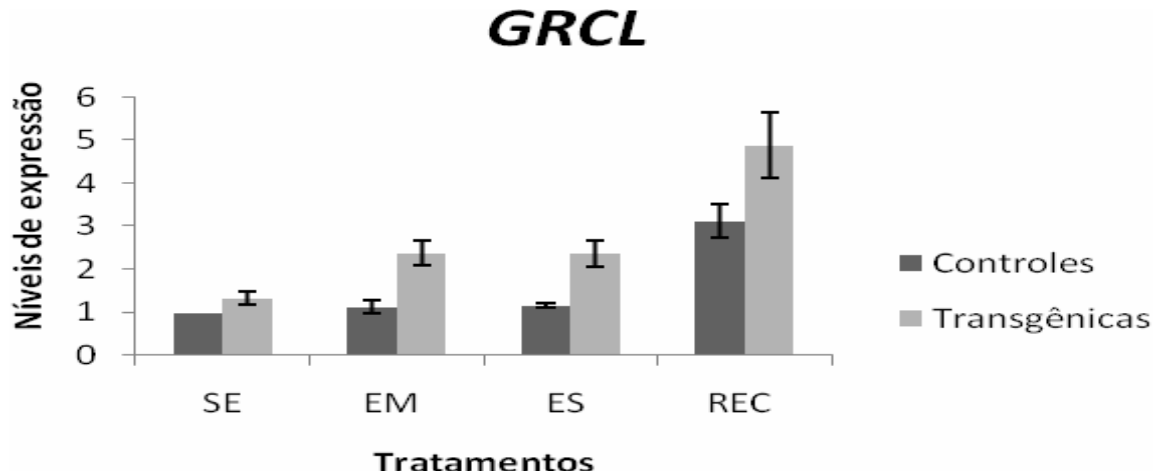
Ao se contrastar as duas isoformas de glutathiona redutase, uma citosólica (*GR*) e uma de cloroplasto (*GRCL*), verificou-se que ambas se comportaram de formas distintas (Figuras 27 e 28). No caso da isoforma presente no citosol, plantas controle e transgênicas de citrumeleiro tiveram seus níveis de transcrição se comportando de forma parecida. Em condições não estressantes a

expressão foi similar para ambas os tipos de plantas. Posteriormente, ocorreu um aumento de expressão no estresse moderado e severo, com posterior redução na recuperação, onde os níveis voltaram àqueles observados antes do estresse (Figura 27), evidenciando que a prolina não teve grande influência na transcrição desta isoforma nos tratamentos utilizados neste trabalho.



**Figura 27** – Níveis de transcrição da glutathione redutase citosólica (*GRcit*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ ).

A análise por PCR em tempo real da atividade transcricional da isoforma de glutathione redutase plastidial (*GRCL*) mostrou que as plantas transgênicas de citrumeleiro com alto acúmulo de prolina produziram mais transcritos do que as controle não transformadas em todos os pontos estudados (Figura 28). Esta superioridade foi mais evidente após a remoção da irrigação, quando as plantas controle não apresentaram aumento da expressão tanto no estresse moderado como no severo. Na recuperação das plantas após o estresse ocorreu maior aumento dos níveis de transcrição em ambos os tipos de plantas. Assim, esses dados mostram que o acúmulo de prolina nas folhas afeta consideravelmente a expressão desta isoforma, diferentemente do ocorrido com a GR citosólica.



**Figura 28** – Níveis de transcrição da glutationa redutase cloroplasto (*GRCL*) em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse;  $\Psi_w = -1,3$  MPa), EM (Estresse moderado;  $\Psi_w = -2,3$  a  $-2,5$  MPa), ES (Estresse severo;  $\Psi_w = -3,8$  a  $-3,9$  MPa), REC (Recuperação 24h após irrigação;  $\Psi_w = -1,3$  a  $-1,9$  MPa). Valores são apresentados por médias  $\pm$  erro padrão (n=3).

#### 5.4 DISCUSSÃO

Embora espécies reativas de oxigênio (ROS) em plantas sejam produzidas em condições normais de crescimento e suas concentrações permaneçam baixas (POLLE, 2001), diversas variações ambientais induzem o aumento da produção de ROS (DESIKAN et al., 2001; PASTORI; FOYER, 2002; KARPINSKI et al., 2003; LALOI et al., 2004).

Quando o oxigênio molecular ( $O_2$ ) sofre redução, ele dá origem a espécies reativas como superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ). Oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) que podem surgir devido à reação do oxigênio com clorofila excitada, também é considerado uma ROS em potencial (MITTLER, 2002). Cada vez mais há resultados indicando que as ROS são moléculas sinalizadoras em diversos processos celulares como interação planta-patógeno, vias de sinalização de hormônios, crescimento, senescência, morte celular programada e respostas a estresses abióticos (MITLLER et al., 2004). O duplo papel das ROS, como tóxicas ou moléculas sinalizadoras, depende da proporção e localização subcelular da geração de ROS, assim a rígida regulação dos níveis de ROS em diferentes compartimentos celulares tem o propósito de sinalizar e proteger de danos oxidativos (FOYER; NOCTOR, 2005).

As plantas possuem a habilidade de remover ROS por produzir diferentes tipos de antioxidantes que são divididos em duas categorias, enzimáticos

e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas catalases, superóxido dismutases, ascorbato peroxidases, monodeidroascorbato redutases, desidroascorbato redutases e glutatona redutases (ASHRAF, 2009). Compreender o comportamento das enzimas antioxidantes em condições estressantes é essencial para identificar genes que as codificam e sua respectiva contribuição na resposta das plantas aos estresses abióticos.

O elevado teor de prolina acumulado em plantas transgênicas de citrumelo 'Swingle' (2,5 vezes maior do que plantas não transformadas) apresentou papel determinante na proteção contra o estresse oxidativo induzido por déficit hídrico. Isto foi demonstrado pelo maior conteúdo de malondialdeído (MDA) obtido em folhas de plantas controle não-transformadas do que em plantas transgênicas durante a imposição do estresse. O MDA é um produto secundário da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, processo mediado pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) (ILANGO VAN *et al.*, 2006). A peroxidação lipídica induz o aumento da permeabilidade de membranas, levando à perda de eletrólitos e funções celulares. Aumentos nos níveis de MDA estão de acordo com resultados obtidos em outros trabalhos (MORAN *et al.*, 1994; PINHEIRO *et al.*, 2004; MOLINARI *et al.*, 2007) mostram que a peroxidação lipídica é mais induzida em sistemas vegetais que não apresentam algum mecanismo de tolerância ao déficit hídrico.

A alteração nos níveis de MDA em plantas controle ocorreu já durante o estresse moderado, atingindo valores máximos no estresse severo como seria esperado. As plantas transgênicas, entretanto, tiveram os níveis de MDA elevados somente no estresse severo, ainda com valores significativamente menores do que em plantas controle. O alto teor de prolina em plantas transgênicas provavelmente atuou na proteção contra a peroxidação lipídica por ativar ou mesmo atuar diretamente na remoção das ROS.

A expressão constitutiva do transgene *P5CSF129A* devido ao promotor CaMV 35S pode ser aferida pela elevada concentração de prolina livre nas folhas nas plantas transgênicas mesmo na condição irrigada. O teor de prolina em plantas controle foi similar ao de plantas transgênicas somente no estresse severo, mas nem por isso houve redução nos níveis de MDA nessa condição. Possivelmente, a prolina atuou na remoção dos radicais livres desde os estágios iniciais do déficit hídrico, impedindo a ocorrência de danos celulares com o prolongamento do estresse. O aumento do teor do aminoácido observado em

plantas controle durante o estresse severo ocorreu como uma resposta natural à imposição ao estresse, já que a síntese da prolina é ativada em condições ambientais adversas como a seca, salinidade, temperaturas extremas e radiação UV, entre outras (DELAUNEY; VERMA, 1993). Além disto, a expressão de transcritos da enzima prolina desidrogenase (ProDH), principal responsável pelo catabolismo deste aminoácido sofre repressão acentuada em condições de estresse, possibilitando ainda maior acúmulo de prolina (VERBRUGGEN et al, 1996).

O gene *P5CSF129A* foi utilizado para transformar geneticamente plantas de tabaco (HONG *et al.*, 2000), que acumularam duas vezes mais prolina do que plantas controle não-transformadas. Quando cultivadas em presença de 200 mM NaCl, as plantas controle apresentaram maior acúmulo de MDA do que as plantas transgênicas. Esses autores também observaram que a aplicação exógena de 120 mM de prolina em células de tabaco não transgênicas aliviou os sintomas do estresse oxidativo na mesma proporção do que em plantas sintetizando altos níveis de prolina endogenamente. Entretanto, estes dados não estão de acordo com o observado por Hare *et al.* (1997) em *Arabidopsis* que mostraram um efeito tóxico, avaliado pela degradação de cloroplastos e mitocôndrias, da aplicação exógena de altas concentrações de prolina.

Ozden *et al.* (2009) também constataram uma relação inversa entre níveis de prolina e MDA em folhas de videira submetidas ao estresse por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ainda, o acúmulo estresse-induzido de prolina em plantas transgênicas de cana-de-açúcar resultou em menores níveis de MDA do que em plantas não-transformadas, mais uma vez constatando o importante papel da prolina na ação contra a peroxidação lipídica (MOLINARI *et al.*, 2007).

O perfil de expressão do gene *P5CS* nativo foi similar em plantas controle e transgênicas, visto que durante o estresse moderado e severo houve um aumento considerável nos níveis de transcritos com drástica redução 24 h após a irrigação. Durante o estresse hídrico houve expressivo aumento da expressão do *P5CS* nativo tanto nas plantas transformadas quanto nas plantas controle, sendo que nos estresses moderado e severo a diferença aumentou para três e duas vezes. Considerando que o nível de prolina livre acumulado nas folhas foi similar nas plantas transgênicas e controle sob estresse severo mesmo com menor transcrição do mutante *P5CS129A*, este fato pode ser decorrente da repressão da transcrição do gene da enzima prolina desidrogenase (PRODH) (Miller *et al.*, 2005), enzima que

possui papel essencial no catabolismo de prolina (KISHOR et al., 2005), ou da perda do seu controle regulatório em condições estressantes. Já durante a recuperação pela reidratação das plantas, nota-se a grande repressão do *P5CS* nativo em ambos os tipos de planta, sendo esta diminuição relacionada com o também decréscimo da concentração de prolina durante este tratamento (Figuras 13 e 15).

Ao se analisar a expressão do transgene *P5CSF129A*, neste caso utilizando como calibrador a condição sem estresse de plantas transgênicas, verificou-se que durante o período de privação de água e 24 após a irrigação, a expressão do transgene se manteve praticamente constante indicando que em citrumeleiro o promotor 35 CaMV proporciona uma estabilidade de transcrição em todas as condições analisadas neste experimento. Isto se reflete nas concentrações de prolina livre (Figura 13), que se apresentaram bastante elevadas, porém praticamente invariáveis durante o estresse hídrico aplicado (Figura 13).

Em condições normais de suprimento de água, a grande concentração de prolina nas plantas transgênicas induziu significativamente a transcrição de *APX1* e *APXCL*, enquanto que a isoforma *APX2* apresentou a mesma expressão em plantas controle e transgênicas. Quanto as duas isoformas citosólicas de catalase, a *CAT1* revelou os mesmo níveis de expressão entre os dois tipos de plantas, diferentemente da isoforma *CAT2* que foi induzida na plantas transgênicas. Entre as SODs, somente no caso da isoforma citosólica *CuZnSOD1* a quantidade de transcritos nas plantas transgênicas não foi maior que a apresentada pelas plantas controle, mesmo que em alguns casos essa superioridade não seja considerável. Já nas duas isoformas de glutathione redutase (GR) analisadas, as plantas transformadas apresentaram expressão de transcritos levemente superiores que as plantas controle.

Assim, dentre todas os genes analisados, os que tiveram a sua expressão notavelmente induzida pela alta concentração de prolina presente nas plantas de citrumeleiro em condições normais de suprimento de água foram *APX1*, *APXCL*, *CAT2* e *CuZnSOD2*, já que a expressão destas foram bastante superiores à apresentada pelas plantas controle nessas condições. De forma contrária, somente a *CuZnSOD1* parece ter sido nitidamente reprimida pela alta concentração de prolina endógena em condições normais de irrigação. Alguns trabalhos demonstram uma relação direta e positiva entre

o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e o nível de prolina (TSUGANE et al., 1999; HONG et al., 2000; OKUMA et al., 2000, 2002). Entretanto, estes trabalhos utilizam altas concentrações de prolina exógena, as quais não são encontradas em condições normais em tecidos vegetais, submetidos ou não a estresses abióticos. Além disso, as espécies vegetais utilizadas acumulam baixos níveis de prolina em comparação às plantas de citros (KOCSY et al., 2005; MOLINARI et al., 2007). Entretanto, convém ressaltar que algumas vezes os níveis transcricionais são pouco relacionados com a atividade enzimática devido aos vários sistemas regulatórios envolvidos na expressão final de proteínas e a participação de diferentes isoenzimas em processos biológicos que ocorrem em níveis temporais e espaciais diversos.

Durante o período de deficiência hídrica, as duas isoformas citosólicas do gene da ascorbato peroxidase *APX1* e *APX2*, tiveram sua transcrição aumentada, principalmente a primeira. Já a isoforma *APXCL* manteve seus níveis no início do estresse com posterior redução. Plantas de arroz submetidas ao déficit hídrico analisadas quanto ao estresse oxidativo e componentes enzimáticos e não enzimáticos de mecanismos de defesa antioxidante, mostraram elevações consistentes da atividade das APXs com o aumento nos níveis de estresse (SHARMA; DUBEY, 2005). Ozden et al. (2009) ao estudar o efeito da prolina no sistema antioxidante de folhas de uva quando submetidas a estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio verificou que na presença de prolina exógena as ascorbato peroxidases aumentaram a sua atividade. Hoque et al. (2007b) verificou que a atividade de APXs diminuiu em resposta ao estresse salino, porém a aplicação exógena de prolina levou a um aumento nesta atividade. Diferentemente das formas citosólicas, APXs de cloroplasto são extremamente suscetíveis à inativação por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (KITAJIMA et al., 2006), o que pode explicar a redução transcricional observada da *APXCL* durante o estresse severo tanto em plantas controle como nas transgênicas, quando a prolina atingiu o seu teor mais alto nas folhas. Este dados mostram que a prolina não colaborou para manter a atividade transcricional da isoforma plastidial em condição tão severa de deficiência hídrica. Concentrações altas de peróxido de hidrogênio produzidas pelo estresse hídrico além da incapacidade do sistema antioxidante de remover ROS em tal nível de estresse podem ter reprimido a transcrição da *APXCL*. O mesmo foi observado por Ozden et al. (2009) em estudos de atividade enzimática onde o estresse por peróxido de hidrogênio aplicado inibiu a APX e mesmo a posterior aplicação exógena de prolina

não eliminou a inibição. Durante estresse moderado, entretanto, plantas transgênicas podem ter mantido a expressão de *APXCL* devido à capacidade da prolina em estabilizar estruturas protéicas. Também, como esta isoforma possui maior atividade catalítica em comparação com as isoformas citosólicas (KITAJIMA et al., 2007), em estresses menos intensos a atividade poderia se manter elevada.

Durante o estresse hídrico a prolina não influenciou a expressão das isoformas *CAT1* e *CAT2*, assim como a isoforma de superóxido dismutase *CuZnSOD2*, como pode ser inferido pela pouca diferença entre a transcrição desses genes em ambos os tipos de plantas. Embora, as outras isoformas de SOD tenham apresentado diferença entre plantas acumulando altas concentrações de prolina e plantas controle, a que demonstrou diferença mais expressiva durante a privação de água foi a SOD presente em mitocôndria (*MnSOD*).

Mesmo a prolina não tendo efeito pronunciado na transcrição das catalases, foi possível verificar que a isoforma *CAT2* teve maior expressão durante o período de estresse. O mesmo foi observado por Du e colaboradores (2008) ao analisarem os perfis de expressão e atividade de três catalases submetidas a diferentes tratamentos em *Arabidopsis thaliana* incluindo seca, frio, estresse oxidativo, ácido abscísico e salicílico. Os resultados revelaram a importância da *CAT1* dessa espécie na remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerados pelos diversos tratamentos; contudo, a *CAT2* foi ativada em baixas temperaturas e em condição de seca de forma mais intensa em comparação com as outras. Já a *CAT3* foi principalmente ativada por ácido abscísico e tratamentos oxidativos. Assim como sugerido por Vanderauwera et al. (2005), a *CAT2* de *A. thaliana* além de contribuir constitutivamente em condições normais, também possui importante papel na resposta ao déficit hídrico e estresse por frio (QUEVAL et al., 2007).

Os resultados com as superóxido dismutases aqui obtidos de uma forma geral concordam com resultados obtidos por Hoque et al. (2007) em estudos sobre a atividade de enzimas antioxidantes sob estresse salino. Estes autores verificaram que o estresse salino não aumentou a atividade de superóxido dismutases mesmo na presença de prolina. Também, dados obtidos por Ozden (2009) evidenciaram que a aplicação exógena de prolina causou um decréscimo de atividade de SODs e CATs em folhas de uva tratadas com peróxido de hidrogênio. Com relação a atividade transcricional, nosso trabalho mostra que tanto nas plantas

controle como nas transgênicas a expressão das isoformas *CuZnSODCL* e *FeSOD* e *APXCL*, localizadas em plastídeos, tiveram sua expressão reduzida.

A presença do alto acúmulo de prolina em função do gene mutante *P5CSF129A* em plantas transgênicas de citrumeleiro durante o estresse hídrico afetou grandemente então a expressão da isoforma *MnSOD*. Protoplastos de trigo com superexpressão de *MnSOD* mostraram baixos níveis de danos oxidativos e uma boa indução da atividade de SODs e GR (MELCHIORE et al., 2009). Contrariamente ao obtido aqui, Banu e colaboradores (2009) apresentaram resultados mostrando que a expressão de RNAm de MnSOD em células de tabaco submetidas a estresse salino não foi alterada pelo estresse independentemente da presença ou ausência da prolina.

Dentre as cinco isoformas de superóxido dismutases analisadas, a isoforma *MnSOD* foi a que mais respondeu à condição de seca e presença de altas concentrações de prolina, demonstrando assim a importante participação desta isoforma de localização mitocondrial na resposta ao estresse oxidativo gerado pelo déficit hídrico.

Ainda durante o período de privação de água, as duas isoformas de glutathione redutase apresentaram elevados níveis transcricionais quando comparadas com as outras enzimas estudadas. Contudo, somente a isoforma presente em cloroplasto (GRCL) sofreu influencia na expressão devido à prolina, já que as plantas transgênicas apresentaram diferença bastante significativa com relação às plantas controle. A isoforma GR citosólica aumentou os níveis de expressão durante o estresse, porém, os níveis obtidos pelas plantas transgênicas não foram maiores que os apresentados pelas plantas controle. Em relação a atividade enzimática, Meloni et al. (2003) estudaram os efeitos do estresse salino sobre a glutathione redutase em duas variedades de algodão que apresentaram comportamentos distintos. Na cultivar Pora a atividade enzimática aumentou em 53% mas a atividade não se alterou mais com altas concentrações de sal. Já na cultivar Guazuncho não houve alteração na enzima. Pinheiro et al. (2004) também verificou aumento da atividade da glutathione redutase como resposta de plantas de café em condições de seca prolongada. Hoque et al. (2007) ao investigar os antioxidantes e a atividade de enzimas envolvidas no ciclo ascorbato-glutathione em células de tabaco submetidas a estresse salino, verificou que a aplicação exógena de prolina aumentou a atividade da glutathione redutase.

Durante a recuperação, a prolina livre mais alta em folhas de citrumeleiro alterou positivamente a expressão das isoformas *APX1*, *CAT1*, *CuZnSODCL* e *GRCL* de forma mais pronunciada. A atuação da prolina em mecanismos de reparo dos danos celulares causados por ROS, no reestabelecimento do estado redox celular e restauração da integridade de membranas pode ser sugerida como razão para a maior expressão destas isoformas. Por outro lado, houve a repressão das isoformas *APX2* e *APXCL*, indicando que a prolina nesta condição não influenciou de forma positiva a expressão destas, demonstrando assim a possibilidade de baixa atuação destas enzimas durante o reparo de danos durante o período de recuperação.

Neste trabalho, foram realizadas análise da expressão por PCR em tempo real de genes codificando isoformas das enzimas catalase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutases e glutathione redutases. Este estudo utilizou como modelo plantas de citrumeleiro normais e plantas transgênicas com alto acúmulo de prolina, devido à inserção do gene mutante de *V. aconitifolia P5CSF129A*, sob condição de déficit hídrico e na recuperação do estresse 24 h após a reidratação. A partir disso, foi verificado que as isoformas *APX1*, *MnSOD* e *GRCL* tiveram sua expressão mais positivamente alterada pelo alto acúmulo de prolina endógena em todas as condições experimentais, incluindo a condição normal de suprimento de água.

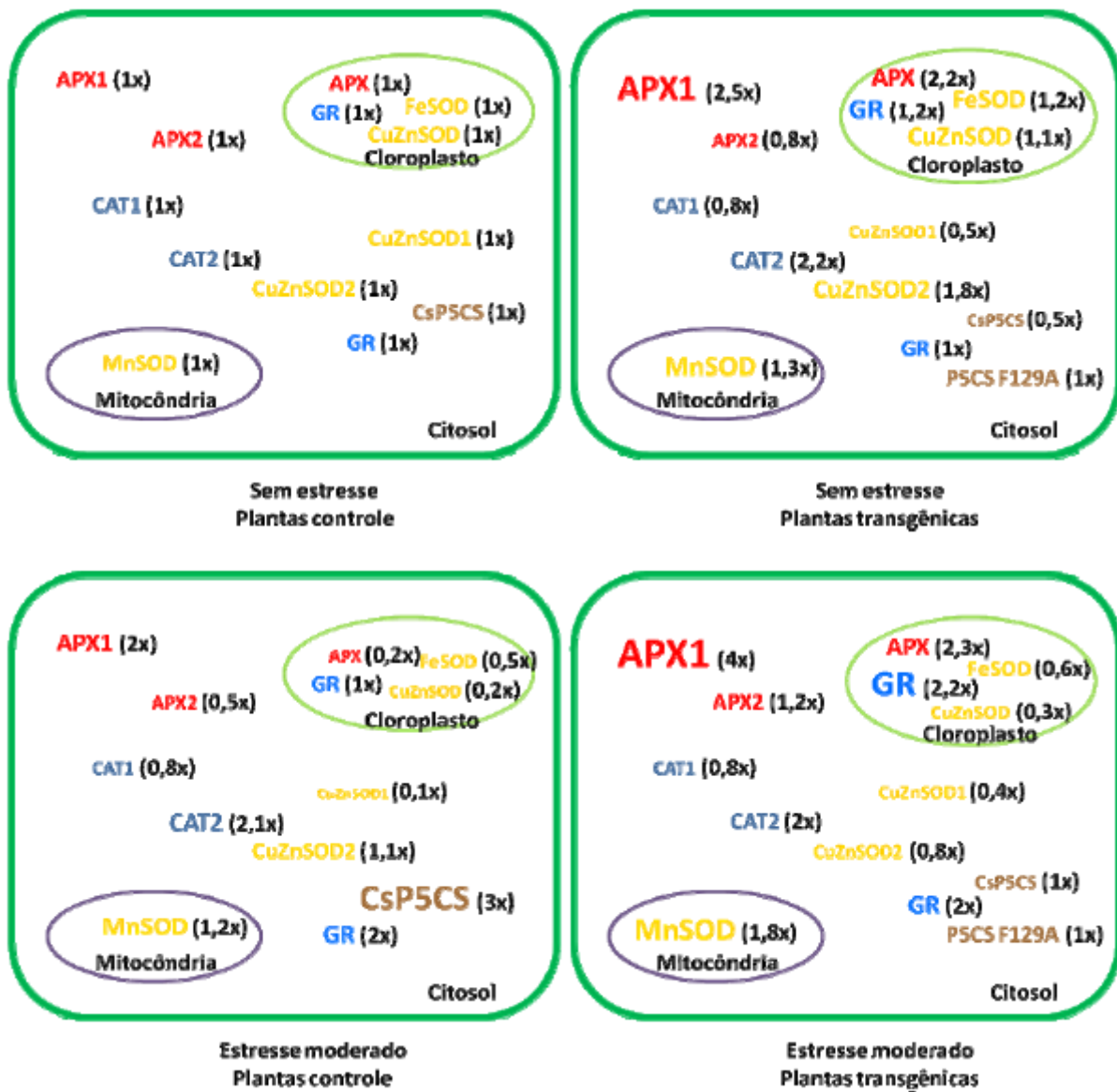
Conhecer quais enzimas são importantes na resposta da planta ao estresse hídrico pode ajudar no desenvolvimento de estratégias para produção de plantas transgênicas. Conforme demonstrado por Lee e colaboradores (2007), a expressão simultânea de três genes codificando enzimas antioxidantes, *CuZnSOD*, *APX* e *DHA* (desidroascorbato redutase) sob controle do promotor constitutivo *CaMV 35S* no cloroplasto de plantas de tabaco mostraram resultados positivos quando submetidas a estresse oxidativo. Além disto, plantas co-expressando mais de um gene antioxidante pode ser bastante vantajoso para múltiplos estresses.

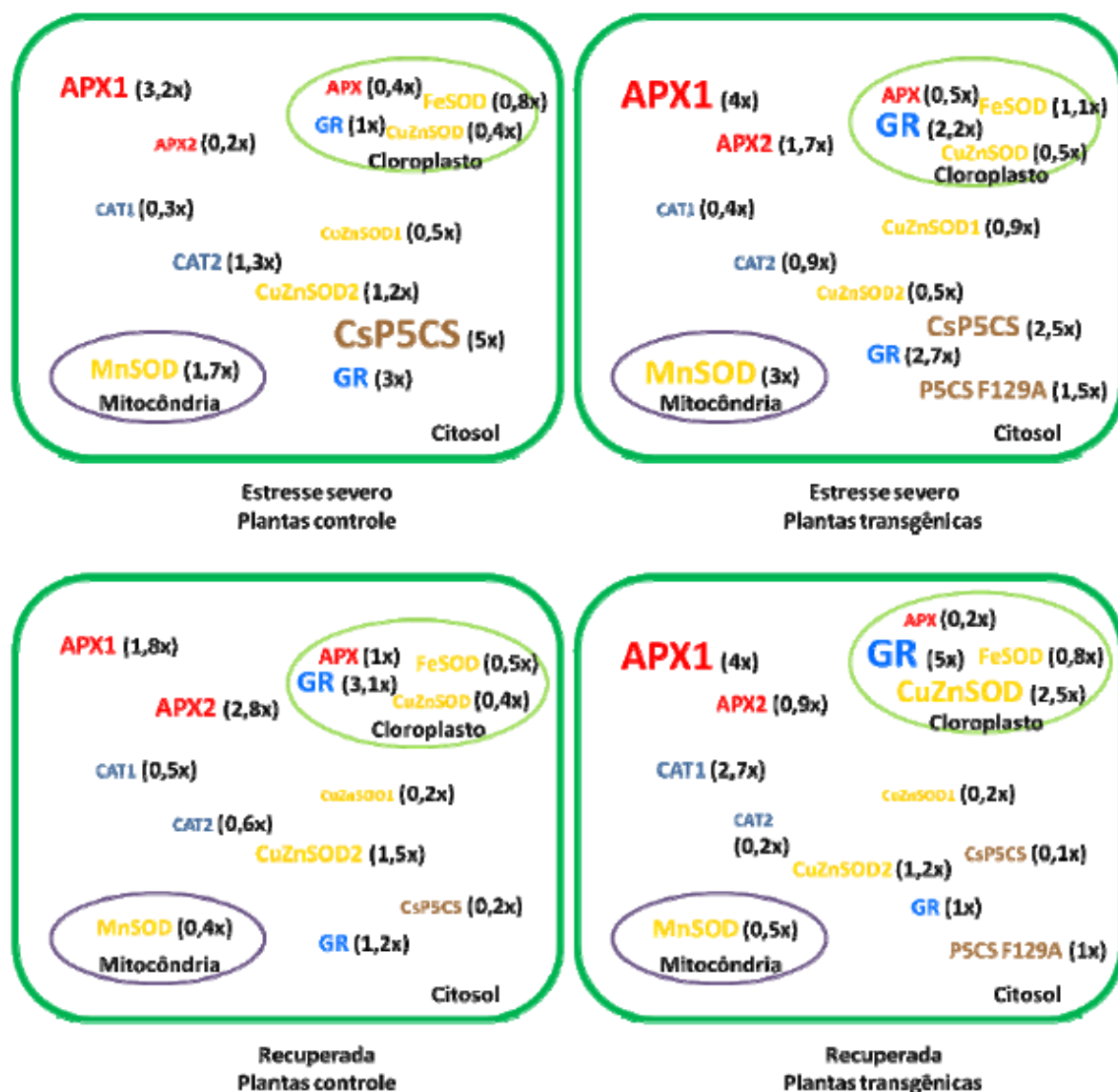
A análise da condição normal de suprimento de água em plantas controle e transgênicas permitiu verificar que o alto acúmulo de prolina realmente conferiu transcrição diferencial das isoformas de enzimas antioxidantes analisadas na maioria dos casos. Desta forma, este aminoácido realmente induziu aumento na transcrição das enzimas, sendo que durante o estresse aplicado ocorreram

variações de resposta entre as enzimas, onde algumas foram mais expressas e outras reprimidas em função da prolina (Figura 29).

Também em relação ao efeito da prolina na atividade de enzimas antioxidantes, SHIGEOKA et al., 2002 sugeriu que a degradação de prolina liberando energia química, como por exemplo NADPH<sub>2</sub>, um agente redutor intimamente ligado ao processo de regeneração do ascorbato, substrato da APX, aumenta a atividade desta enzima. Assim, a quebra da prolina pode levar à ativação de enzimas antioxidantes que vão ajudar a reestabelecer as condições celulares dos danos provocados pelo estresse. Ainda, há vários relatos que a atividade de enzimas antioxidantes diminui em células submetidas a estresse abiótico (MISHRA; DAS, 2003; MITTOVA et al., 2004), porém, na presença de prolina esta atividade aumenta (KHEDR et al., 2003; CHEN; DICKMAN, 2005).

Os efeitos da prolina na atividade de enzimas antioxidantes, como APX, CAT e SOD já foram objeto de vários estudos, porém são escassos os trabalhos que mostram a influência da alta concentração intracelular deste aminoácido na expressão dos genes que codificam estas enzimas. Ainda, estes estudos utilizam aplicações exógenas do aminoácido, não havendo relatos referentes à transcrição destes genes em plantas acumulando elevados níveis endógenos de prolina, como é o caso de plantas cítricas. Os resultados aqui relatados demonstram que o alto acúmulo de prolina em plantas transgênicas de citrumeleiro Swingle alterou a transcrição de genes de enzimas antioxidantes mesmo em condições normais de suprimento de água. Também, foi possível demonstrar a que este aminoácido modificou os perfis transcricionais de diferentes isoformas desses genes em plantas submetidas ao déficit hídrico e durante a recuperação do estresse. Estes resultados também fornecem informações inéditas para o entendimento da regulação de processos biológicos em resposta a estresses abióticos, mostrando que a prolina pode atuar como uma molécula regulatória/sinalizadora capaz de alterar a expressão de genes envolvidos nas respostas das plantas a condições que induzem a estresses oxidativos.





**Figura 29** – Esquema demonstrando as expressões relativas ao calibrador (planta não transformada em condições normais de irrigação – 1x) obtidas dos genes APX, SOD, CAT, GR, suas isoformas e o gene P5CS nativo e transgene P5CSF129A em seus respectivos compartimentos celulares. O calibrador do gene P5CSF129A foi a condição normal de plantas transgênicas. A proporção das expressões está representada pelo tamanho das letras.

## CONCLUSÕES

O alto acúmulo de prolina presente em plantas de citrumeleiro Swingle expressando o gene mutante *P5CSF129A* conferiu aumento na expressão da maioria das isoformas analisadas em condições normais de superimento de água. Nestas condições, as isoformas mais influenciadas positivamente foram as *APX1*, *APXCL*, *CuZnSOD2* e *CAT2*. Durante o período de déficit hídrico a prolina apresentou maior atuação sobre as isoformas *APX1*, *APX2*, *APXCL*, *MnSOD* e *GRCL* aumentando a expressão destas. Já durante a recuperação, as isoformas alteradas positivamente em plantas transgênicas foram *APX1*, *CAT1*, *CuZnSODCL* e *GRCL*.

## REFERÊNCIAS

- ABECITRUS. Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos. Ribeirão Preto, 2007. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br/>>. Acesso em: 15 ago. 2007.
- ABECITRUS. Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos. Ribeirão Preto, 2008. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br/>>. Acesso em: 15 nov. 2008.
- ALIA, P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline. In: 1st Annual User Meeting of the Free Radical Research Facility Daresbury, at Council for the Central Laboratory of the Research Councils, Daresbury, Cheshire, UK, 2003.
- ALIA, P.; SARADHI, P.; MOHANTY, P. Proline enhances primary photochemical activities in isolated thylakoid membranes of *Brassica juncea* by arresting photoinhibitory damage. **Biochem.**, v. 181, p. 1238-1244, 1991.
- ALSCHER, R. G.; DONAHUE, J. L.; CRAMER, C. L. Molecular responses to reactive oxygen species: multifaceted changes in gene expression. IN: DE KOK, L. J.; STULEN, I. (Ed.). Responses of plant metabolism to air pollution and global change. Leiden, The Netherlands: Backhuys publishers, p. 233-240, 1998.
- ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res**, v.64, p.5245-5250, 2004.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annu Rev Plant Biol**, v. 55, p. 373–99, 2004.
- ARMENGAUD, P.; THIERY, L.; BUHOT, N.; MARCH, G. G.; SAVOURE, A., Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. **Physiol. Plant.**, v. 120, p. 442–450, 2004.
- ASADA, K. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. Philosophical Transactions of the Royal Society B: **Biological Sciences**, v. 355, p. 1419-1431, 2000.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annu Rev Plant Physiol Mol Biol**, v.50, p. 601-639, 1999.
- ASHRAF, M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. **Biotechnology Advances**, v.27, p. 84-93, 2009.
- ASSAD, E. D. Portal do Agronegócio: Transgênicos resistentes à seca, 2008. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br>. Acesso em: 12 nov. 2008.
- AUE, D. H. et al. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 98, p. 311, 1976

AYLIFFE, M.A. ; ROBERTS, J.K. ; MITCHELL, H.J. ; ZHANG, R. ; LAWRENCE, G.J. ; ELLIS, J.G. ; PRYOR, J.T. A plant gene up-regulated at rust infection sites. **Plant Physiol**, v. 129, p.169–180, 2002.

BANU, N.A. et al. Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 146-156, 2009.

BARBER, R.D.; HARMER, D.W.; COLEMAN, R.A.; CLARK, B.J. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. **Physiol Genomics**, v.21, p. 389-395, 2005.

BARSALOBRES-CAVALLARI, C. et al. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea Arabica* under different experimental conditions. **BMC Molecular Biology**, ???vol. pgs?? 2009.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 24, p.23–58, 2005.

BEZIER, A.; LAMBERT, B.; BAILLIEUL, F. Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p.111–120, 2002.

BLUMER, S. Citrandarins e outros tipos de trifoliolate como porta-enxertos nancantes para a larenjeira “Valencia” (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Tese de doutorado. ESALQ – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

BLUMWALD, E. Sodium transport and salt tolerance in plants. **Current Opinion in Cell Biology**, n. 4, v. 12, p. 431-434, 2000.

BOGGESE, S.F.; ASPINALL, D.; PALEG, L. Stress metabolism IX. The significance of end-product inhibition of proline biosynthesis and of compartmentation in relation to stress-induced proline accumulation. **Aust J Plant Physiology**, v. 3, p. 513–525, 1976a.

BOGGESE, S.F.; STEWART, C.R.; ASPINALL, D.; PALEG, L. Effect of water stress on proline synthesis from radioactive precursors. **Plant Physiology**, v.58, p. 398–401, 1976b.

BONEFELD, B.; ELFVING, B.; WEGENER, G. Reference genes for normalization: A study of rat brain tissue. **Synapse**, v.62, p. 302-309, 2008.

BOWLER, C. et al. Superoxide dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 13, p. 199-218, 1994.

BOWLER, C.; VAN CAMP, W.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 13, p. 199-218, 1994.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 83-116, 1992.

BRAY, E.A. et al. Responses to abiotic stresses. In: GRUISSEM, W.; BUCHANNAN, B.; JONES, R. eds. **Responses to Abiotic Stresses**. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, p.1158-1249, 2000.

BRAY, E.A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 48-54, 1997.

BRUNNER, A.M.; YAKOVLEV, I.A.; STRAUSS, S.H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. **BMC Plant Biology**, 2004.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. **American Society of Plants Physiologists**, 1366p., 2000.

BUSTIN SA, BENES V, NOLAN T, PFAFFL MW. Quantitative real-time RT-PCR -a perspective. **J Mol Endocrinol**, v. 34, p.597-601, 2005.

BUSTIN SA. Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences. **Expert Rev Mol Diagn**, v.5, v.493-498, 2005.

CANDOLFI-VASCONCELOS, M. C.; KOBLET, W.; HOWELL, G.S.; ZWEIFEL,

W. Influence of defoliation, rootstock, training system, and leaf position on gas exchange of Pinot noir grapevines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.45, n.2, p.173-180, 1994.

CARBONNEAU, A. The early selection of grapevine rootstocks for resistance to drought conditions. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.36, n.3, p.195-198, 1985.

CASADO, Vânia. **Pólos de fruticultura crescem no Paraná**. Grupo de Consultores em Citros, Cordeirópolis, 06 jul. 2004. Disponível em: <<http://www.gconci.com.br/>>. Acesso em: 31 jan. 2005.

CEPEA. Centro de estudos avançados em economia agrícola. Disponível em:<<http://www.cepea.esalq.usp.br>>. Acesso em: 26 jan. 2009.

CERQUEIRA, E. C.; NETO, M. T. C; PEIXOTO, C. P.; FILHO, W. S. S.; LEDO,

C. A. S.; OLIVEIRA, J. G. Resposta de porta-enxertos de citros ao déficit hídrico. **Ver. Brás. Frutic.** Jaboticabal – SP, v.26, n.3, p.515-519, 2004.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolation RNA for pine trees. **Plant Molecular Biology**, v.11, p.113-116, 1993.

CHEN, C.; DICKMAN, M.B. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, p. 3459-3464, 2005.

CHEW, O.; WHELAN, J.; MILLAR, H. Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. **J Biol Chem**, v.278, p.46869–46877, 2003.

CITROLIMA, 2005. Disponível em: <<http://www.citrolima.com.br/portaenxertos/swingle.htm>>. Acesso em: 12/01/09.

CLARKE, J.D.; ZHU, T. Microarray analysis of the transcriptome as a stepping stone towards understanding biological systems: Practical considerations and perspectives. **Plant Journal**, v. 45, p. 630-650, 2006.

CORPAS, F. J.; SANDALIO, L. M.; DEL RÍO, L. A.; TRELEASE, R. N. Copper-zinc superoxide dismutase is a constituent enzyme of the matrix of peroxisomes in the cotyledons of oilseed plants. **New phytologist**, v. 138, p. 307-314, 1998.

COULSON, D.T.R et al. Identification of valid reference genes for the normalization of RT qPCR gene expression data in human brain tissue. **BMC Molecular Biology**, v 9, p.46, 2008.

CREISSEN, G. P.; EDWARDS, E. Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. In: FOYER, C. H.; MULLINEAUX, P. M. (Eds.) Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants, p. 343-364, 1994.

CZECHOWSKI, T.; BARI, R.P.; STITT, M.; SCHEIBLE, W.R.; UDVARDI, M.K. Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: Unprecedented sensitivity reveals novel root-and shoot-specific genes. **Plant Journal**, v. 38, p. 366-379, 2004.

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M.K.; SCHEIBLE,

W.R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, v. 139, p. 5-17, 2005.

DAVLETOVA, S.; RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHENGQIANG, Z.; OLIVER, D.J.; COUTU, J.; SHULAEV, V.; SCHLAUCH, K.; MITTLER, R. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.17, p.268–281, 2005.

DEAN, J.D.; GOODWIN, P.H.; HSIANG, T. Comparison of relative RT-PCR and northern blot analysis to measure expression of  $\beta$ -1,3- glucanase in *Nicotiana tabacum* infected with *Colletotrichum destructivum*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 20, p. 347-356, 2002.

DEL RÍO, L. A.; DONALDSON, R. P. Production of superoxide radicals and superoxide dismutase activity in gluoxisomal membranes from castor bean endosperm. **Journal of Plant Physiology**, v. 146, p. 283-287, 1995.

DEL RÍO, L. A.; SANDALIO, L. M.; ALTOMARE, D. A.; ZILINZKAS, B. A. Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 293-933.

DEL RÍO, L.A. et al. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Exp. Botany**, v. 53, p. 1255-1272, 2002.

DE-LACERDA, C.F.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M.A.; RUIZ, H.A.; PRISCO, J.T. Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. **Environ. Exp. Bot.**, v. 49, p. 107–120, 2003.

DELAUNEY, A.J. et al. Cloning of ornithine

DELAUNEY, A.J.; VERMA, D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **Plant Journal**, v. 4, p. 215-223, 1993.

DEMIRAL, T.; TURKAN I. Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 1089-1100, 2004.

DESIKAN, R. et al. Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. **Plant Physiol.**, v.27, p. 159-72, 2001.

DEUSCHLE, K.; FUNCK, D.; FORLANI, G.; STRANSKY, H.; BIEHL, A.; LEISTER, D.; VANDER GRAAFF, E.; KUNZE, R.; FROMMER, W.B. The role of D1pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. **Plant Cell**, v. 16, p. 3413–3425, 2004.

DEUSCHLE, K.; FUNCK, D.; HELLMANN, H.; DASCHNER, K.; BINDER, S.; FROMMER, W.B. A nuclear gene encoding mitochondrial D1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. **Plant J**, v. 27, p. 345–355, 2001.

DHEDA, K.; HUGGETT, J.F.; CHANG, J.S.; KIM, L.U.; BUSTIN, S.A.; JOHNSON, M.A.; ROOK, G.A.; ZUMLA, A. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. **Anal Biochem**, v. 344, p. 141-143, 2005.

DING, J.; JIA, J.; YANG, L.; WEN, H.; ZHANG, C.; LIU, W.; ZHANG, D. Validation of a rice specific gene, sucrose phosphate synthase, used as the endogenous reference gene for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes. **J Agric Food Chem**, v.52, p.3372-3377, 2004.

DOOREMBOS, J.; KASSAM, A.H. Yield response to water. In: \_\_\_\_\_ **Irrigation and drainage paper**. Roma: FAO, 1979. pt 33, p.179.

DROILLARD, M. J.; PAULIN A. Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. **Plant Physiology**, v. 94, p. 1187-1192, 1990.

DRUMM-HERREL, H.; GERH/IUBER, U.; MOHR, H. Differential regulation by phytochrome of the appearance of plastidic and cytoplasmatic isoforms of glutathione reductase in mustard (*Sinapsis alba* L.) cotyledons. **Planta**, v. 178, p.103-109, 1989.

DU, Y. et al. Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.50, p. 1318-1326, 2008.

DUKE, M. V.; SALIN, M. L. Isoenzymes of cuprozinc superoxide dismutase from *Pisum sativum*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 2369-2373, 1983.

EDWARDS, E.A.; RAWSTHORNE, S.; MULLINEAUX, P.M. Sub-cellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). **Planta**, v.180, p. 278-284, 1990.

EJIRI, S. Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 66, p.1–21, 2002.

ELSTNER, E. F. Oxygen radicals: biochemical basis for their efficacy. **Journal of Molecular Medicine**, v. 69, n. 21, p.449-956, 1991.

EXPOSITO-RODRIGUEZ, M; BORGES, A.A.; BORGES-PEREZ, A.; PEREZ,

J.A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, 2008.

FABRO, G.; KOVACS, I.; PAVET, V.; SZABADOS, L.; ALVAREZ, M.E. Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidospis*. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 17, p. 343–350, 2004.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT: 1962-2003. Disponível em: <<http://apps.fao.org/>>. Acesso em 3 fev., 2005.

FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plant: stomatal and non-stomatal limitations revisited. **Ann Bot**, v. 89, p. 183-189, 2002.

FNP. Consultoria & Comercio. Agrianual 2006: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2006. P. 257-270: laranja. Disponível em: < <http://www.fnp.com.br/> >. Acesso em 13 out, 2006.

FOYER CH. Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. In: **Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses**, edited by Scandalios JG. New York: Cold Spring Harbor, p. 587–621, 1997.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. **The Plant Cell**, v.. 17, p.1866–1875, 2005.

FOYER, C.; LELANDAIS, M.; GALAP, C.; KUNERT, J. Effect of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. **Plant Physiol**. v. 97, p. 863-872, 1991.

FOYER, C.H.; HALLIWELL, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta** v. 133, p. 21–25, 1976.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n.4, 2009.

FOYER, C.H.; TREBST, A.; NOCTOR, G. Signaling and integration of defense functions of tocopherol, ascorbate and glutathione. In **Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment**, edited by Demmig-Adams B and Adams WW. Dordrecht, The Netherlands: Springer, p. 241–268, 2006.

FRANK, W. et al. Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. **Plant Cell**, v.12, p.111-124, 2000.

FUNDECITRUS. **PENSA/USP faz mapeamento e quantifica a importância da laranja**. Araraquara: São Francisco Gráfica e Editora, mai/jun, p. 8-9, 2004.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p. 1445-1454, 2004.

GCONCI. Grupo de Consultores em Citros, 2008. Disponível em: <<http://www.gconci.com.br/>>. Acesso em: 15 out., 2008.

GIRAUDAT, J. et al. Current advances in abscisic acid action and signaling. **Plant Molecular Biology**, v.26, p.1557-1577, 1994.

GOMEZ, J.M. et al. Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. **Free Radical Research**, v. 31, p. 11–18, 1999.

GÓMEZ, J.M. et al. Location and effects of long term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. **Journal of Exp. Botany**, v.55, p. 119-130, 2004.

GÓMEZ, J.M.; JIMÉNEZ, A.; OLMOS, E.; SEVILLA, F. Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplast. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 119-130, 2004.

GONEN, H. D.; DICKMAN, A. L.; SCHWARTZ, A.; CIECHANOVER. Protein synthesis elongation factor EF-1 is an isopeptidase essential for ubiquitin-dependent degradation of certain proteolytic substrates. **Adv. Exp. Med. Biol.**,

v. 389, p. 209–219, 1996.

GRATÃO, P.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v.32, p. 481-494, 2005.

GUIRADO, N. et al. Declínio dos citros. In: \_\_\_\_\_ **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p. 722-734.

GUTIERREZ, L.; MAURIAT, M.; GUENIN, S.; PELLOUX, J.; LEFEBVRE, J.F.; LOUVET, R.; RUSTERUCCI, C.; MORITZ, T.; GUERINEAU, F.; BELLINI, C.; VAN WUYTSWINKEL, O. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnol J**, 2008.

HAMILTON, G. A. Chemical and biochemical reactivity of oxygen. In PELL, E.; STEFFEN, K. Active oxygen-oxidative stress and plant metabolism. New York: **American Society of Plants Physiologists**, p. 5-12, 1991.

HANDA, S. et al. Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. **Plant Physiology**, v.80, p.938-945, 1986.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Dissecting the holes of osmolyte accumulation during stress. **Plant Cell Environment**, v. 21, p. 535-553, 1998.

HARE, P.D., CRESS, W.A., STADEN, J.V. Disruptive effects of exogenous proline on chloroplast and mitochondrial ultrastructure in Arabidopsi leaves. **South African J. Bot.**, v. 68, p. 393–396, 2002.

HARE, P.D.; CRESS, W.A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v.21, p.79-102, 1997.

HASEGAWA, P. M. et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity. An. Rev. Plant. Physiol. **Plant Molec. Biol.**, v. 51, p. 463-499, 2000.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**, 8:R19, 2007.

HELLMANN, H.; FUNCK, D.; RENTSCH, D.; FROMMER, W.B. Hypersensitivity of an Arabidopsis sugar signaling mutant toward exogenous proline application. **Plant Physiol**, v. 122, p. 357–367, 2000.

HERNANDEZ, J.A.; CAMPILLO, A.; JIME ÂNEZ, A.; ALARCO ÂN, J.J.; SEVILLA, F. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. **New Phytologist**, v. 141, p. 241-251, 1999.

HERNANDEZ, J.A.; CORPAS, F.J.; GO ÂMEZ, M.; DEL RIO, L.A.; SEVILLA, F. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 89, p.103-110, 1993.

HERNANDEZ, J.A.; JIME ÂNEZ, A.; MULLINEAUX, P.; SEVILLA, F. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with the induction of antioxidant defences. **Plant Cell and Environment**, v.23, p. 853-862, 2000.

HERNANDEZ, J.A.; OLMOS, E.; CORPAS, F.J.; SEVILLA, F.; DEL RIO, L.A. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. **Plant Science**, v. 105, p.151-167, 1995.

HERNÁNDEZ, J.A. et al. Antioxidant system and O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves: its relation with salt-induced necrotic lesion in minor veins. **Plant Physiology** v. 127, p. 817-831, 2001.

HONG, S et al. Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. **BMC Plant Biology**, v. 8, p.112, 2008.

HONG, S-Y et al. Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. **BMC Plant Biology**, 2008.

HONG, Z.; LAKKINENI, K.; ZHANG, Z.; VERMA, D.P.S. Removal of feedback inhibition of 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiol.** 122, 1129–1136, 2000.

HOQUE, M.A. et al Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. **Journal of Plant Physiology**, 2007.

HOQUE, M.A. et al. Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate–glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells. **Journal of Plant Physiology**, 2007(b).

HOQUE, M.A. et al. Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. **Journal of Plant Physiology**, v.165, p. 813-824, 2008.

HUA, X.J.; VAN DE COTTE, B.; VAN MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. The 50 untranslated region of the At-P5R gene is involved in both transcriptional and post-transcriptional regulation. **Plant J**, v. 26, p.157–169, 2001.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, 2004.

IACONO, F.; BUCCELA, A.; PETERLUNGER, E. Water stress and rootstock influence on leaf gas exchange of grafted and ungraf grapevines. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v.75, p.27-39, 1998.

IEA. Instituto de Economia Agrícola. São Paulo, 2000. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/>. Acesso em: 14 fev., 2000.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.377–403, 1996.

INSITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA, 2007. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 14 ago. 2007.

INZE, D.; VAN MONTAGU, M. Oxidative stress in plants. **Current Opin in Biotechnology**, v. 6, p. 153-158, 1995.

ISHIKAWA, T.; YOSHIMURA, K.; SAKAI, K.; TAMOI, M.; TAKEDA, T.; SHIGEOKA, S. Molecular characterization and physiological role of a glyoxysome-bound ascorbate peroxidase from spinach. **Plant Cell Physiol**, v. 39, p.23–34, 1998

ISKANDAR, H.M. et al. Comparison of Reference Genes for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.22, p.325–337, 2004.

JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A.K.; KHURANA, JP. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by - 16 - quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2006.

JIAN, B.; LIU, B.; BI, Y.; HOU, W.; WU, C.; HAN T. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v.9, p.59, 2008.

JITHESH, M.N.; PRASHANTH, S.R.; SIVAPRAKASH, K.R.; PARIDA, A. Monitoring expression profiles of antioxidant genes to salinity, iron, oxidative, light and hyperosmotic stresses in the highly salt tolerant grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. by mRNA analysis. **Plant Cell Report**, v. 25, p. 865-876, 2006.

JOHN DEERE. Disponível em:< [http://www.deere.com/pt\\_BR/ag/infocenter](http://www.deere.com/pt_BR/ag/infocenter)>. Acesso em: 26 jan. 2009.

JUNG, C.; SEO, J.S.; HANS, S. W. et al. Overexpression of At MYB 44 enhances stomatal closure to confer abiotic stresses tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Phys.**, v.146, p.623 – 635, 2008.

JUNG, S. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. **Plant Science**, v. 166, p. 459-466, 2004.

KARPINSKI, S. et al. Light perception in plant disease defense signaling. **Curr. Opin. Plant. Biol.**, v. 6, p. 390-6, 2003.

KAVAR, T.; MARAS, M.; KIDRIC, M.; SUSTAR-VOZLIC, S. MEGLIC, V. Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. **Mol. Breed.**, v.21, p.159-172, 2008.

KAVI KISHOR, P.B. et al. Overexpression of <sup>1</sup>-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline overproduction and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, v.108, p.1387-1394, 1995.

KETCHUM, R.E.B.; WARREN, R.C.; KLIMA, L.J.; LOPEZ-GUTIERREZ, F.;NABORS, M.W. The mechanism and regulation of proline accumulation in suspension cultures of the halophytic grass *Distichlis spicata* L. **Journal of Plant Physiology** v.137, p.368-374, 1991.

KHEDR, A.H.A et al. Proline induces the expression of salt stress responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancratium maritimum* L. to salt stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 2553-2562, 2003.

KIM, B.R.; NAM, H.Y.; KIM, S.U.; KIM, S.I.; CHANG, Y.J. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. **Biotechnol Lett**, v. 25, p.1869-1872, 2003.

KISHOR, P.B.K. et al. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Curr. Science**, v. 88, 2005.

KITAJIMA, S.; SHIMAOKA, T.; KURIOKA, M.; YOKOTA, A. Irreversible crosslinking of heme to the distal tryptophan of stromal ascorbate peroxidase in response to rapid inactivation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **FEBS J**, v. 274, p. 3013–3020, 2007.

KITAJIMA, S.; TOMIZAWA, K.; SHIGEOKA, S.; YOKOTA, A. An inserted loop region of stromal ascorbate peroxidase is involved in its hydrogen peroxide-mediated inactivation. **FEBS J**, v.273, p. 2704–2710, 2006.

KOCSY, G.; LAURIE, R.; SZALAI, G.; SZILAGYI, V.; SIMON-SARKADI, L.; GALIBA, G.; DE RONDE, J. A. Genetic manipulation of proline levels affects antioxidants in soybean subjected to simultaneous drought and heat stress. **Physiologia Plantarum**, v. 124, p. 227–235, 2005.

KORNYEYEV, D.; LOGAN, B.A.; ALLEN, R.D.; HOLADAY, A.S. Effect of chloroplastic overproduction of ascorbate peroxidase on photosynthesis and photoprotection in cotton leaves subjected to low temperature photoinhibition. **Plant Sci**, v.165, p.1033–1041, 2003.

KORNYEYEV, D.; LOGAN, B.A.; PAYTON, P.; ALLEN, R.D., HOLADAY, A.S. Enhanced photochemical light utilization and decreased chilling-induced photoinhibition of photosystem II in cotton overexpressing genes encoding chloroplast targeted antioxidant enzymes. **Physiol Plant**, v. 113, p. 323–331, 2001.

KUZINIAK, E. Transgenic plants: An insight into oxidative stress tolerance mechanisms. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 24, p. 97-113, 2002.

LALOI, C.; APEL, K.; DANON, A. Reactive oxygen signalling: the latest news, **Curr. Opin. Plant. Biol.**, v. 7, p. 323-8, 2004.

LANGER, K.; ACHE, P.; GEIGER, D.; STINZING, A.; AREND, M.; WIND, C.; REGAN, S.; FROMM, J.; HEDRICH, R. Poplar potassium transporters capable of controlling K<sup>+</sup> homeostasis and K<sup>+</sup> dependent xylogenesis. **The Plant Journal**, v. 32, p. 997–1009, 2002.

LEDO, A. S.; LEDO, J. S.; RITZINGER, R.; SOBRINHO, A. P. C. Porta-enxerto para laranjeiras doces (*Citrus sinensis* (L.) Osb.), em Rio Branco, Acre. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 7, 1999.

LEONARDIS, S.; DIPIERRO, N.; DIPIERRO, S. Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 773-779, 2000.

LIBAULT, M.; THIBIVILLIERS, S.; BILGIN, D.; RADWAN, O.; BENITEZ, M.; CLOUGH, S.; STACEY, G. Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. **The Plant Genome**, v. 1, p.44-54, 2008.

LIBAUT, M. et al. Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. **The Plant Genome**, v. 1, n. 1, 2008.

LIMA, A.L.S. et al. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p. 239-247, 2002.

- LIU, G.W.M.; GRANT, D.; PERSKY, V.M.; LATHAM, R.H.; SINGER, J. CONDEELIS. Interaction of elongation factor 1 with F-actin and actin mRNA: implications for anchoring mRNA in cell protrusions. **Mol. Biol. Cell**, v.13, p. 579–592, 2002.
- LIVAK, J.K.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LU, Z.; LIU, D.; LIU, D. Two Rice cytosolic ascorbate peroxidase differentially improve salt tolerance in transgenic Arabidopsis. **Plant Cell Report**, v. 26, p. 1909-1917, 2007.
- LUDWIG, A.A. et al. CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. **Journal of Experimental Botany**, n.395, v.55, p.181-188, 2004.
- LUTTS, S.; MAJERUS, V.; KINET, J.M. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Physiol. Plant.**, v.105, p. 450–458, 1999.
- MACHADO, E.C. et al. Deficiência hídrica agrava os sintomas fisiológicos da clorose variegada dos citros em laranja 'Natal'. **Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 373-379, 2007.
- MADAN, S. et al. Proline and proline metabolizing enzymes in *in-vitro* selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress. **Annals of Botany**, v.76, p.51-57, 1995.
- MAGGIO, A.; MIYAZAKI, S.; VERONESE, P.; FUJITA, T.; IBEAS, J.I.; DAMSZ, B.; NARASIMHAN, M.L.; HASEGAWA, P.M.; JOLY, R.J.; BRESSAN, R.A. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? **Plant Journal**, v. 31, p. 699–712, 2002.
- MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Arch Biochem Biophys**, v. 444, p. 139-58, 2005.
- MALICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response to algal cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, p. 183-193, 2000.
- MANI, S.; VAN DE COTTE, B.; VAN MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in Arabidopsis. **Plant Physiol**, v. 128, p.73–83, 2002.
- MARTINEZ-CAYUELA, M. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 39, p. 5-18, 1998.
- MATYSIK, J.; ALIA, BHALU, B. AND MOHANTY, P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. **Curr. Sci.**, v. 82, p.525–532, 2002.
- MAY, M.J.; VERNOUX, T.; SANCHEZ-FERNANDEZ, R.; VAN MONTAGU, M.; INZED. Evidence for post-transcriptional activation of G-glutamylcysteine synthetase during plant stress responses. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 12049–12054, 1998.

MAZZUCOTELLI, E. et al. Abiotic stress responses in plants: when post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. **Plant Science**, v.164, p.420-431, 2008.

MEDINA, C. L.; MACHADO, E. C. Trocas gasosas e relações hídricas em laranja 'Valência' enxertada sobre limoeiro 'Cravo' e Trifoliata e submetida à deficiência hídrica. *Bragantia*, v. 57, p. 15–22, 1998.

MEDINA, C.L. Fotossíntese, relações hídricas e alterações bioquímicas em laranja 'Pêra' com CVC e submetida à deficiência hídrica. Tese (Doutorado)

– Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002, 147 p.

MELONI, D.A.; OLIVA, M.A.; MARTINEZ, C.A.; CAMBRAIA, J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.49, p. 69-76, 2003.

MENEGUZZO, S.; SGHERRI, C.L.M.; NAVARI-IZZO, F.; IZZO, R. Stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in NaCl-treated leaves. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 735-740, 1998.

MENEZES-BENAVENTE, L.; TEIXEIRA, F.K.; KAMEI, C.L.A.; MARGIS-PINHEIRO, M. Salt stress induces altered expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian indica rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**, v. 166, p. 323-331, 2004.

MICKLEBURGH, I.H.; CHABANON, D.; NURY, K.; FAN, B.; BURTLE, Z.; CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS; J. HESKETH. Elongation factor 1 $\alpha$  binds to the region of the metallothionein-1 mRNA implicated in perinuclear localization—importance of an internal stem-loop. **RNA**, v. 12, p. 1397–1407, 2006.

MILLER, G. et al. Responsive modes of *Medicago sativa* proline dehydrogenase genes during salt stress and recovery dictate free proline accumulation. *Planta*, v.222, p. 70–79, 2005.

MISHRA, S.; DAS, A.B. Effect of NaCl on leaf salt secretion and antioxidant enzyme level in roots of a mangrove. *Aegiceras corniculatum*. **Indian J Exp Bot**, v.41, p. 160-164, 2003.

MITLLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci**, v.7, p. 405-10, 2002.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Sci**, v.9, p. 490–498, 2004.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends Plant Sci**, v. 11, p. 15–19, 2006.

MITTOVA, V.; GUY, M.; TAL, M.; VOLOKITA, M. Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. **J Exp Bot**, v.55, p. 1105-1113, 2004.

MOLINARI, H.B.C. et al. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Obs.x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v.167, p.1375-1381, 2004.

MULLINEAUX, P. M.; CREISSEN, G. P. Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. In: SCANDALIOS, J. C. (Ed.). **Oxidative stress and Molecular Biology of Antioxidant Defenses**, p. 667-1997.

MURGIA, I.; TARANTINO, D.; VANNINI, C.; BRACALE, M.; CARRAVIERI, S.; SOAVE, C. Arabidopsis thaliana plants over-expressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide induced cell death. **Plant J**, v. 38, p.940–953, 2004.

NANJO, T. et al. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v.2, p.185-193, 1999.

NANJO, T.; FUJITA, M.; SEKI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHINOZAKI, K. Toxicity of free proline revealed in an Arabidopsis T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. **Plant Cell Physiol.**, v. 44, p. 541–548, 2003.

NEVES, M.F.; LOPES, F.F. (Org.). Estratégias para a laranja no Brasil. São Paulo: **Atlas**, 225p., 2005.

NICOT, N.; HAUSMAN, J-F.; HOFFMANN, L.; EVERS, D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. **J Exp Bot**, v. 56, p.2907-2914, 2005.

NOLAN, T.; HANDS, R.E.; BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nat Protoc**, v. 1, p.1559-1582, 2006.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. **Biotecnologia, Ciência & Sociedade**, v.33, p. 10-13, 2004.

OBBER, E.S. et al. Evaluation of physiological traits as indirect selection criteria for drought tolerance in sugar beet. **Field Crop Res.**, v. 91, p. 231-249, 2005.

OGAWA, K.; KANEMATSU, S.; ASADA, K. Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignifications. **Plant and Cell Physiology**, v. 38, p. 1118-1126, 1997.

OGAWA, K.; KANEMATSU, S.; TAKABE, K.; ASADA, K. Attachment of Cu-Zn superoxide dismutase to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplasts: detection by immunogold labeling after rapid freezing and substitution method. **Plant and Cell Physiology**, v. 36, p. 565-573, 1995.

OHL, F.; JUNG, M.; RADONIC, A.; SACHS, M.; LOENING, S.A.; JUNG, K. Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies of human bladder cancer. **J Urol**, v. 175, p.1915-1920, 2006.

OKUMA, E. et al. Effects of exogenous application of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions. **Soil Sci Plant Nutr**, v.50, p. 1301-1305, 2004.

OKUMA, E. et al. Exogenous proline mitigates the inhibition of growth of *Nicotiana tabacum* cultured cells under saline conditions. **Soil Sci Plant Nutr**, v.46, p.257-63, 2000.

ORTOLANI, A. et al. Agroclimatologia e o cultivo de citros. In: \_\_\_\_ **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, p.153-195, 1991.

OZDEN, M.; DEMIREL, U.; KAHRAMAN, A. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 163–168, 2009.

PAHLICH, E.; KERRES, R.; JAGER, H-J. Influence of water stress on the vacuole/extravacuole distribution of proline in protoplasts of *Nicotiana rustica*. **Plant Physiology**, v.72, p.590-591, 1993.

PANCHUK, I.I.; VOLKOV, R.A.; SCHOFFL, F. Heat stress and heat shock transcription factor dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1-16, 2002.

PAPINI-TERZI, F.S.; ROCHA, F.R.; VÊNCIO, R.Z.; OLIVEIRA, K.C.; FELIX, J.D.E.M.; VICENTINI, R.; ROCHA, C.D.E.S.; SIMÕES, A.C.; ULIAN, E.C.; DI MAURO, S.M.; DA SILVA, A.M.; PEREIRA, C.A.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. **DNA Res**, v. 12, p.27-38, 2005.

PASTORI, G.M. ; MULLINEAUX, P.M. ; FOYER, C.H. Post-transcriptional regulation prevents accumulation of glutathione reductase protein and activity in the bundle sheath cells of maize. **Plant Physiol** 122: 667–675, 2000.

PASTORI, G.M; FOYER, C.H. Common components, network and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of redox and abscisic acid-mediated controls. **Plant. Physiol.**, v. 129, p. 460, 468, 2002.

PAYTON, P.; WEBB, R.; KORNYEYEV, D.; ALLEN, R.; HOLADAY, A.S. Protecting cotton photosynthesis during moderate chilling at high light intensity by increasing chloroplastic antioxidant enzyme activity. **J Exp Bot** 52: 2345– 2354, 2001.

PFAFFL, M.W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Bestkeeper-Excel-based tool using pairwise correlations. **Biotechnology Letter**, v. 26, p. 509-515, 2004.

PINHEIRO, H.A. et al. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Science**, v. 167, p. 1307-1314, 2004.

POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway by metabolic modeling: computer analysis as a step towards flux analysis. **Plant Physiol.**, v. 126, p. 445-462, 2001.

POMBO-SUAREZ, M.; CALAZA, M.; GOMEZ-REINO, J.J.; GONZALEZ, A. Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage. **BMC Mol Biol**, 2008.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (eds.) **Citros**. Campinas: 2005. Cap. 4.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In:\_\_\_\_\_. **Citricultura Brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p. 265-280.

QUEVAL, G. et al. Conditional oxidative stress responses in the Arabidopsis photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – induced cell death. **Plant Journal**, v. 52, p. 640-657, 2007.

RADONIC A, THULKE S, MACKAY IM, LANDT O, SIEGERT W, NITSCHKE A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, p. 856– 862, 2004.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p.123-130, 2003.

RODRÍGUEZ-SERRANO, M. et al. Peroxisomal membrane manganese superoxide dismutase: characterization of the isozyme from watermelon (*Citrullus lanatus* Schrad.) cotyledons. **Journal of Experimental Botany**, 2007.

ROOK, F.; HANDINGHAM, S.A.; LI, Y.; BEVAN, M.W. Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. **Plant Cell Env.**, v. 29,

p. 426-434, 2006.

SAIRAM, R.K.; RAO, K.V.; SRIVASTAVA, G.C. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolytes concentration. **Plant Science**, v. 163, p. 1037-1046, 2002.

SANDALIO LM, DEL RI'Ó LA. Intraorganellar distribution of SOD in plant peroxisomes (glyoxysomes and leaf peroxisomes). **Plant Physiology**, v. 88, p. 1215–1218, 1988.

SANDALIO LM, DEL RI'Ó LA. Localization of superoxide dismutase in glyoxysomes from *Citrullus vulgaris*. Functional implications in cellular metabolism. **Journal of Plant Physiology**, v. 127, p. 395–409, 1987.

SANDALIO, L. M.; LÓPEZ-HUERTAS, E.; BUENO, P.; DEL RÍO, L. A. Immunocytochemical localization of copper,zinc superoxide dismutase in peroxisomes from watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad) cotyledons. **Free Radical Research**, v. 26, p. 187-194, 1997.

SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; DEL RIO, L.A. Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L. **Plant Science**, v. 51, p.1-8, 1987.

SARADHI, A.; SARADHI, P.P. Proline accumulation under heavy metal stress. **Journal of Plant Physiology**, v.138, p.554-558, 1991.

SARADHI, P.P. et al. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.209, p.1-5, 1995.

SAWAHE, W. A. AND HASSAN, A. H. Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. **Biotechnology Letters** v. 24, p. 721–725, 2002.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant genes defenses. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCANDALIOS, J. G. Regulation and properties of plants catalases. In: FOYER, C.H.; MULINUEAUX, P.M. (Ed.). Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. Boca Ratón: **CRC press**, p. 275-315, 1994.

SCHAFER, G.; GEN, N. V. P.; SARTORI, I. A.; SCHWARZ, S. F.; KOLLER, O.

C. Produção e desenvolvimento da tangerineira 'Montenegrina' propagada por enxertia e estaquia, no Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal – SP, v. 23, n.3, p. 668-672, dez, 2001.

SCHAFLEITNER, R. et al. Proline accumulation and real time PCR expression analysis of genes encoding enzymes of proline metabolism in relation to drought tolerance in Andean potato. **Acta Physiol Plant**, v. 29, p. 19-26, 2007.

SCHMITTGEN, T.D.; ZAKRAJSEK, B.A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real time quantitative RT-PCR. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v.46, p.69-81, 2000.

SCHOBERT, B.; TSCHESCHE, H. Unusual solution properties of proline and its interactions with proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Acta. 541, p.270-277, 1978.

SEAB. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. Disponível em: <<http://www.seab.pr.gov.br>>. Acesso em: 15 out., 2008.

SECEX. Secretaria de Comércio Exterior, 2008. Disponível em: <<http://www2.desenvolvimento.gov.br/sitio/secex.php>>. Acesso em 18 nov., 2008.

SEKI, M.; UMEZAWA, T.; URANO, K.; SHINOZAKI, K. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.10, p.296-302, 2007.

SHAO, H-B; GUO, Q-J; CHU, L-Y; ZHAO, X-N; SU, Z-L; HU, Y-C; CHENG, J-F. Understanding molecular mechanisms of higher plant plasticity under abiotic stress. **Sci. Dir.**, v.54, p.37-45, 2007.

SHARMA, P.; DUBEY, R.S. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Growth regulation**, v. 46, p. 209-221, 2005.

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and Function of Ascorbate Peroxidase Isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1305-1319, 2002.

SHIINA, N., Y. GOTOH, N. KUBOMURA, A. IWAMATSU, AND E. NISHIDA. Microtubule severing by elongation factor 1a. **Science**, v. 266, p.282–285, 1994.

SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Gene expression and signal transduction in water stress response. **Plant Physiol.** v.115, p.327-334, 1997.

SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Molecular responses to drought and cold stress. **Curr. Opin. Biotechnol.** n.7, p.161-167, 1996.

SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: difference and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 3, p. 217-223, 2000.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.3, p.217–23, 2000.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Curr. Opin. Plant Biol.** V. 6, p. 410–17, 2003.

SIVAKUMAR, P.; SHARMILA, P.; SARADHI, P.P. Proline alleviates salt-stress induced enhancement in ribulose-1-5-bisphosphate oxygenase activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 279, p. 512-515, 2000.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytol.**, v. 125 p. 27-58, 1993.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 28, p. 1057-1060, 1989.

SONJA, V-J. et al. Senescence and drought related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of *Ramonda serbica*. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p. 1759-1768, 2006.

STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C., SEMPIONATO, O. R. Yield and fruit quality of 'Pera' sweet orange clone IAC on 16 rootstocks in Bebedouro region, State of São Paulo, Brazil. **Rev. Ras. Frutic.**, v. 26, n. 2, p. 359-362, aug. 2004.

STURZENBAUM, S.R.; KILLE, P. Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 130, p. 281–289, 2001.

SYVERTSEN, J.P.; GRAHAM, J.H. Hydraulic conductivity of roots, mineral nutrition, and leaf gas exchange of Citrus rootstocks. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 61, p. 464-468, 1985.

SZE'KELY, G.; ABRAHAM, E.; CSEPLO, A.; RIGO, G.; ZSIGMOND, L.; CSISZAR, J.; AYAYDIN, F.; STRIZHOV, N.; JASIK, J.; SCHMELZER, E.; KONCZ, C.; SZABADOS, L. Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. **Plant J**, v. 53, p.11–28, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 719p, 2004.

TANG, L. et al. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. **Physiology and Biochemistry**, v. 25, p. 1380-1386, 2006.

TARZE, A.; DENIAUD, A.; LE BRAS, M.; MAILLIER, E.; MOLLE, D.; LAROCLETTE, N.; ZAMZAMI, N.; JAN, G.; KROEMER, G.; BRENNER, C. "GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization". **Oncogene**, v.26, p. 2606–2620, 2007.

TEIXEIRA FK, MENEZES-BENAVENTE L, MARGIS R, MARGIS-PINHEIRO M. Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. **J Mol Evol**, v. 59, p.761–770, 2004.

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

TEÓFILO SOBRINHO, J. Variedades copas e porta-enxertos para os citros. In: \_\_\_\_\_ MENTEN, J.O.M. et al. **Curso intensivo de citricultura**. Piracicaba: ESALQ, 1991, p. 25-36.

TEZARA, W.; MITCHALL, V.; DRISCOLL, S.P.; LAWLOR, D.W. Effects of water deficit and its interaction with CO<sub>2</sub> supply on the biochemistry and physiology and photosynthesis in sunflower. **Journal of Experimental Botany**, v. 375, p. 1781-1791, 2002.

THOMAS C, MEYER D, WOLFF M, HIMBER C, ALIOUA M, STEINMETZ A. Molecular characterization and spatial expression of the sunflower ABP1 gene. **Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 1025–1036, 2003.

VALLADARES F, ALLEN MT, AND PEARCY RW. Photosynthetic responses to dynamic light under field conditions in six tropical rainforest shrubs occurring along a light gradient. **Oecologia**, v.111, p. 505–514, 1997.

VAN BREUSEGUEM, F.; VRANOVA, E.; DAT, J. F.; INZE, D. The role of reactive oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, 2001.

VAN CAMP, W.; CAPIAU, K.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; SLOOTEN, L. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-SOD in chloroplasts. **Plant Physiology**, v. 40, p. 1703-1714, 1996.

VAN RENSBURG, L. et al. Proline accumulation as drought tolerance selection criterion: Its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 141, p. 188-194, 1993.

VANDERAWERA, S. et al. Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. **Plant Physiol.**, v. 139, p. 806-821, 2005.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETTER, K.; PATTYN, F. POPPE, B.; ROY, N. V.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, 3 (7), 2002.

VERBRUGGEN, N. et al. Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulated. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 8787-8791, 1996.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, n. 4, 2008.

VOETBERG, G.S.; SHARP, R.E. Growth of the maize primary root tip at low water potentials. III. Role of increased proline deposition in osmotic adjustment. **Plant Physiology**, v.96, p.1125-1130, 1991.

VOLKOV, R.A.; PANCHUK, I.I.; SCHOFFL, F. Heat stress dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of housekeeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real time RT-PCR. **J. Exp. Bot.**, v. 54, p. 2343-2349, 2003.

WARDOWSKI, W.F. et al. **Fresh Citrus Fruits**. New York: An AVI Book, 1986, 571 p.

WARRINGTON JA, NAIR A, MAHADEVAPPAM, TSYGANSKAYAM. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. **Physiological Genomics**, v. 2, p.143-147, 2000.

WERNER, J.E.; FINKELSTEIN, R.R. *Arabidopsis* mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. **Physiologia Plantarum**, v.34, p.913-922, 1995.

WILLIAMS TD, GENSBERG K, MINCHIN SD, CHIPMAN JK. A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*). **Aquatic Toxicology**, v. 65, p.141-157, 2003.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v. 39, n.1, 2005.

WU, G.; WILEN, R. W.; ROBERTSON, A. J.; GUSTA, L. V. Isolation, chromosomal localization, and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and chloroplastic copper-zinc superoxide dismutase genes in wheat. **Plant Physiology**, v. 120, p. 513-520, 1999.

WUTSCHER, H.K.; BISTLINE, F.W. Performance of 'Hamlin' orange on 30 citrus rootstocks in southern Florida. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 113, p. 493-497, 1988.

XIANG, C.; OLIVER, D. J. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 10, p. 1539-1550, 1998.

XIONG, L.; LEE, H.; ISHITANI, M.; ZHU, J.K. Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in Arabidopsis. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p.8588-96, 2002.

YABUTA Y, MOTOKI T, YOSHIMURA K, TAKEDA T, ISHIKAWA T, AND SHIGEOKA S. Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress. **Plant J**, v. 32, p. 915-925, 2002.

YAHUBYAN, G. et al. Prompt response of superoxide dismutase and peroxidase to dehydration and rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Plant Growth Regul.**, v. 57, p. 49-56, 2009.

ZHANG, C.S. et al. Removal of feedback inhibition of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first 2 steps of proline biosynthesis in plants. **Journal of Biological Chemistry**, n. 270, p.20491-20496, 1995.

ZHANG, C.S.; LU, Q.; VERMA, D.P.S. Characterization of P5CS gene promoter in transgenic *Arabidopsis thaliana* subjected to water stress. **Plant Sci.**, v. 129, p. 81-89, 1997.

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

## **ANEXOS**

## ANEXO A

Eficiência de amplificação dos primers dos genes “housekeeping” e genes que codificam para as enzimas antioxidantes.

<b>Gene</b>	<b>Eficiência de amplificação (%)</b>
APX1	70
APX2	93
APX cloroplasto	97
CAT1	100
CAT2	100
CuZnSOD1	100
CuZnSOD2	98
CuZnSOD cloroplasto	70
FeSOD	100
MnSOD	100
GR citosólica	93
GR cloroplasto	92
P5CS nativo	100
P5CS transgene	100
Actina	85
GAPDH	88
EF1 $\alpha$	99
$\beta$ -TUB	99
Catepsina	99
Ciclofilina	78
ADP	97

Curvas de dissociação dos genes candidatos a normalizadores e genes antioxidantes e suas isoformas:

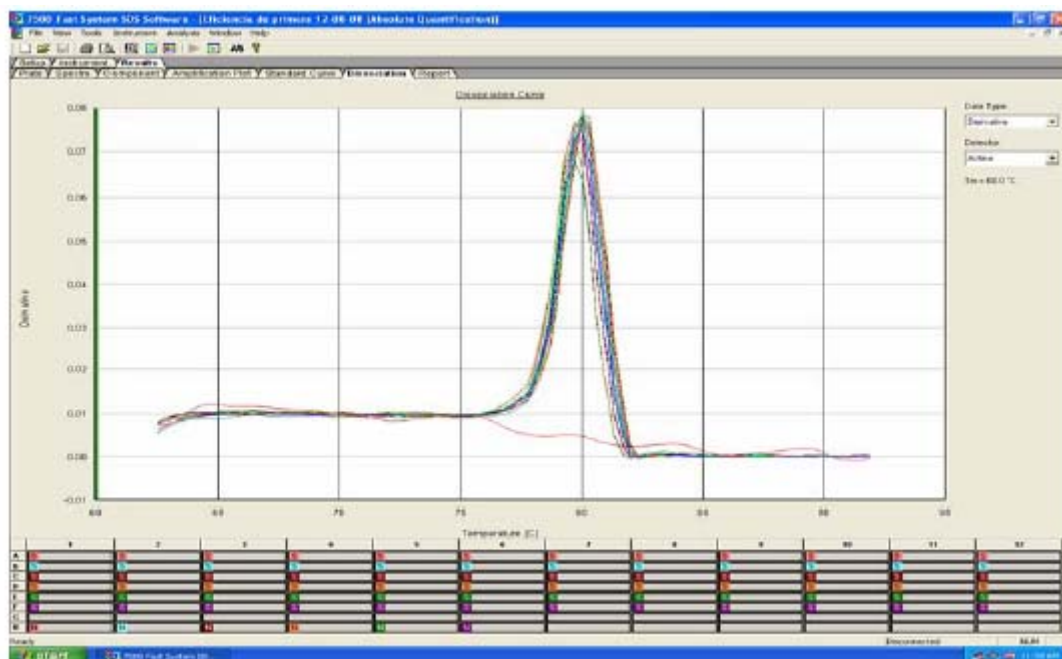


Figura 1 – Curva de dissociação do gene Actina (ACT).

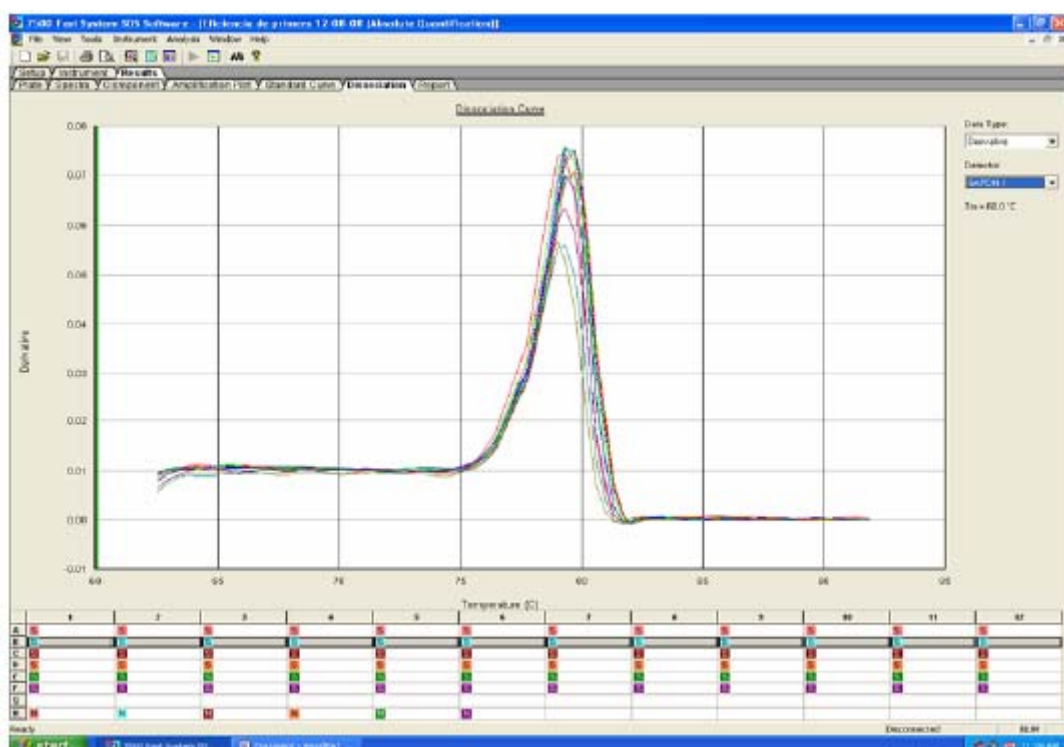


Figura 2 – Curva de dissociação do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

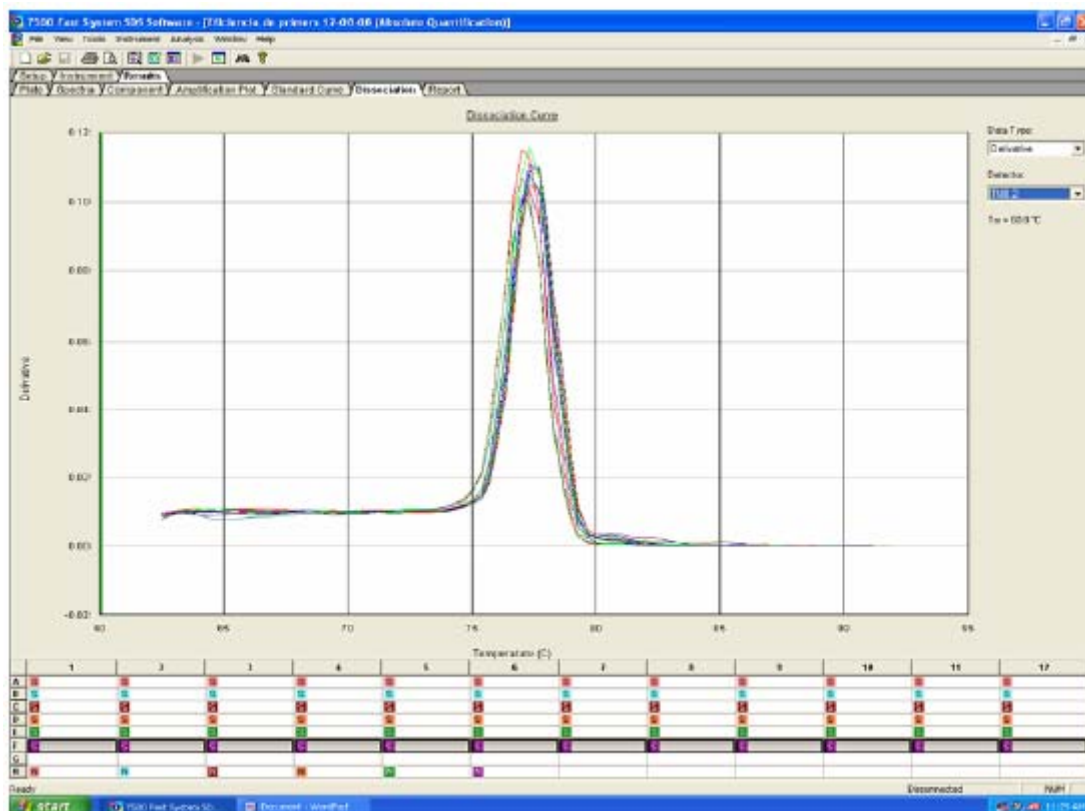


Figura 3 – Curva de dissociação do gene  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -TUB).

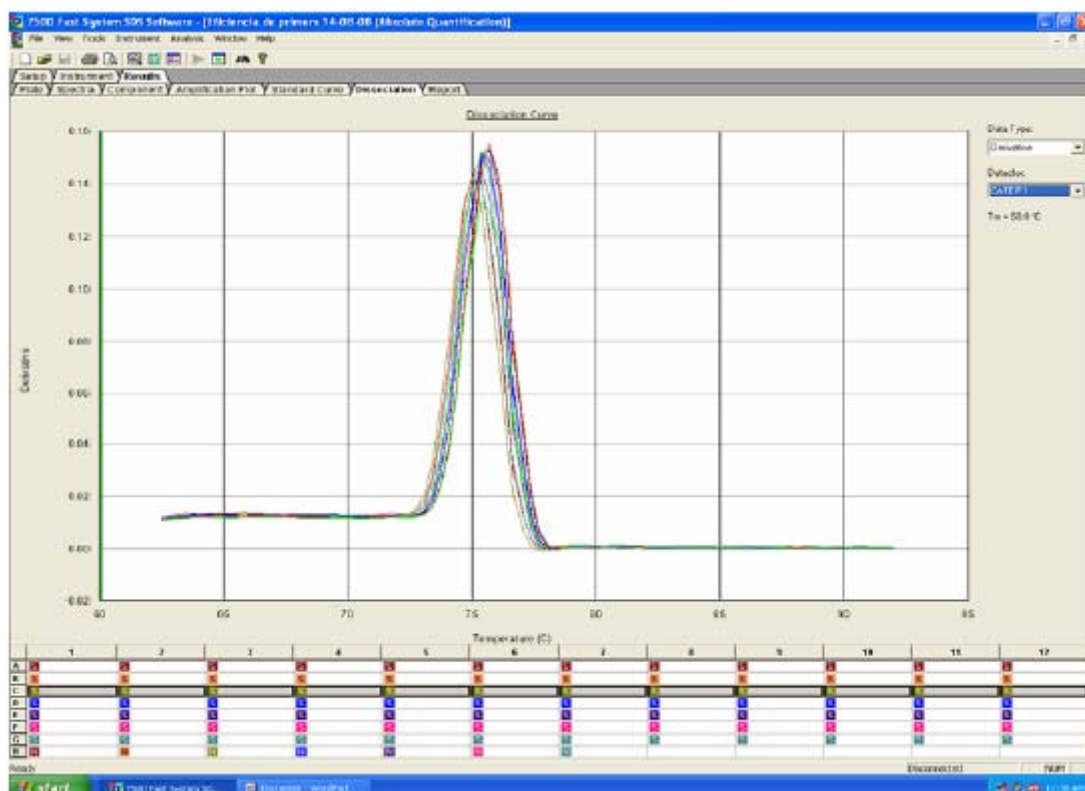


Figura 4 – Curva de dissociação do gene catepsina (*CtP*).

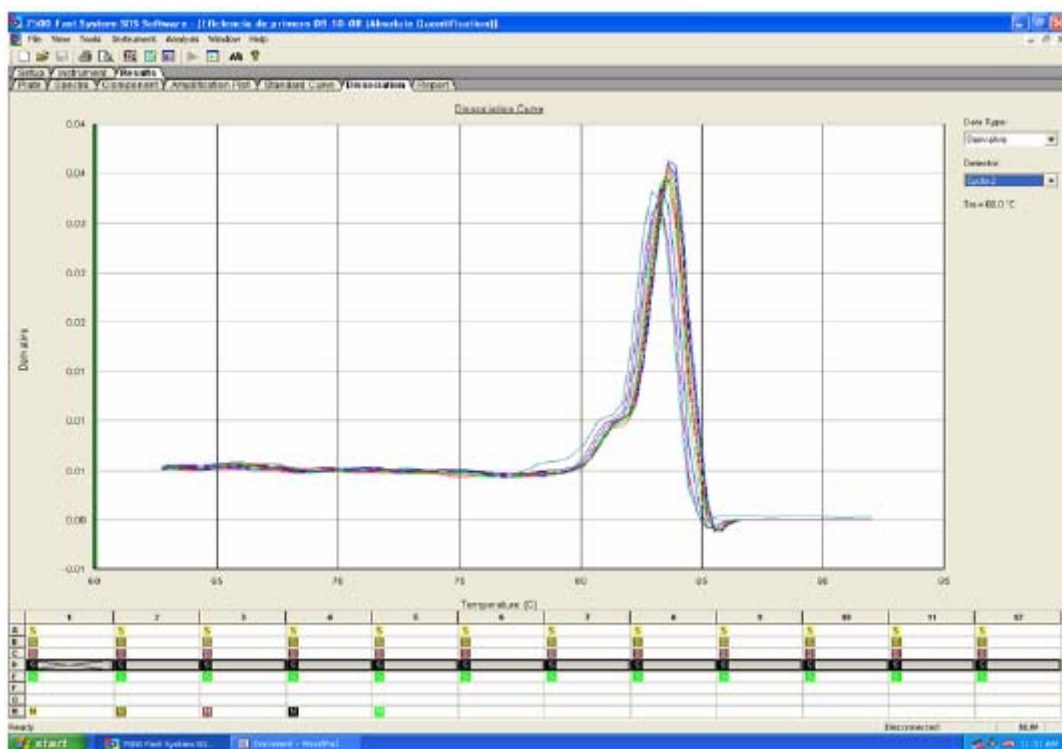


Figura 5 – Curva de dissociação do gene ciclofilina (CYP).

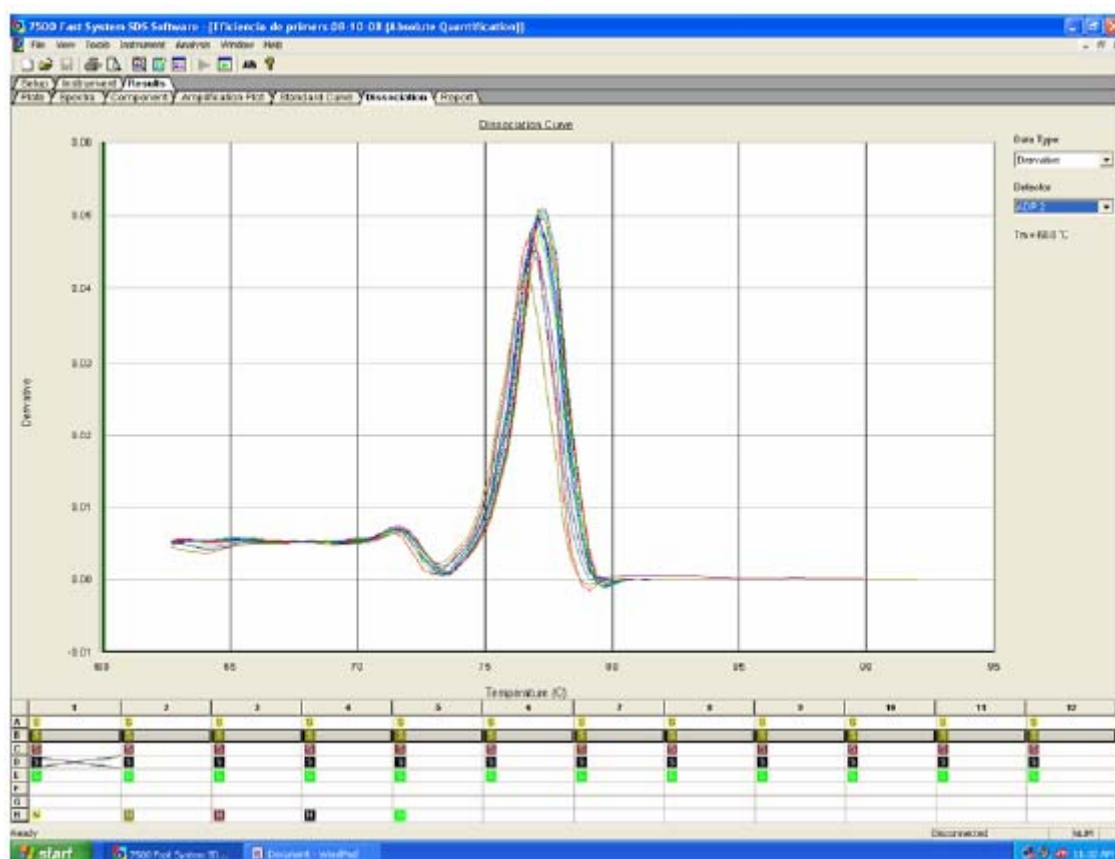


Figura 6 – Curva de dissociação do gene ADP – fator de ribosilação (ADP).

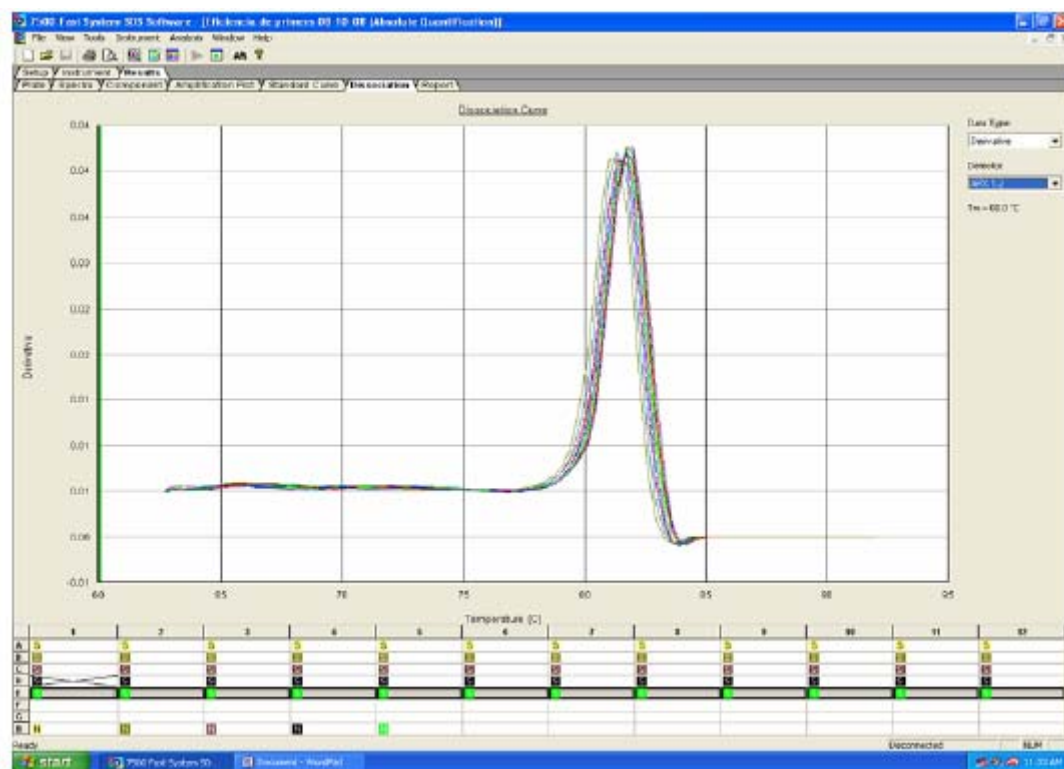


Figura 7 – Curva de dissociação do gene ascorbato peroxidase isoforma 1 (APX1).

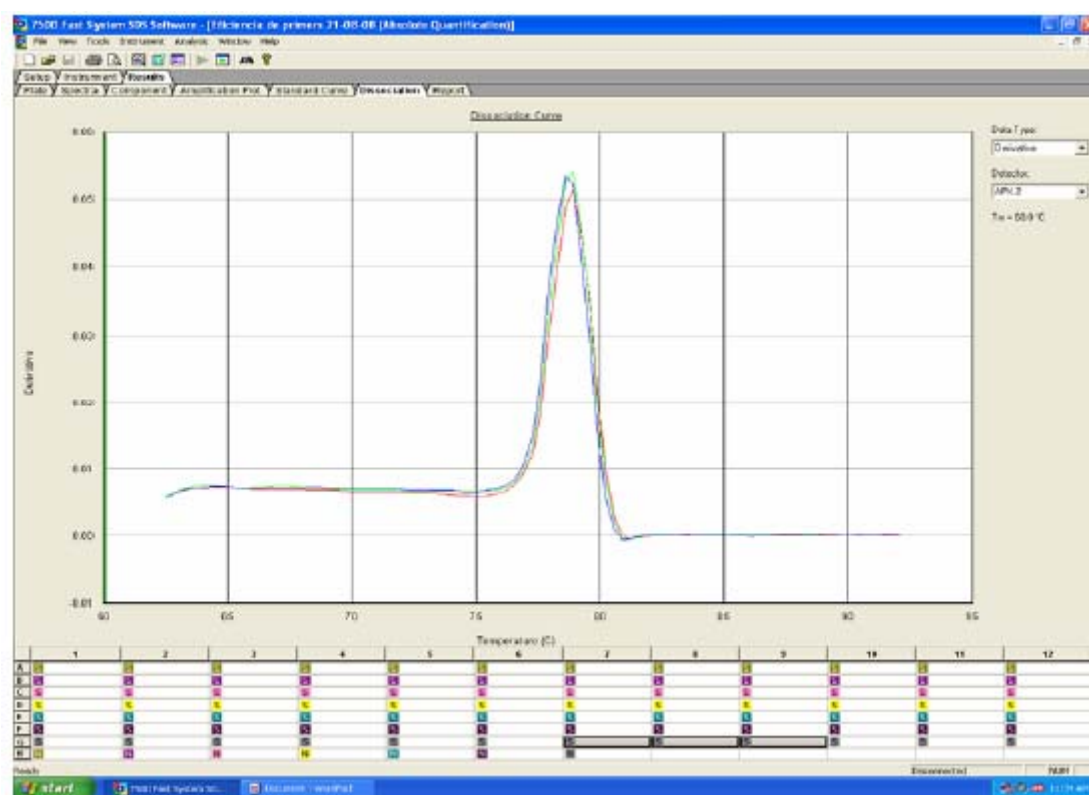


Figura 8 – Curva de dissociação do gene ascorbato peroxidase isoforma 2 (APX2).

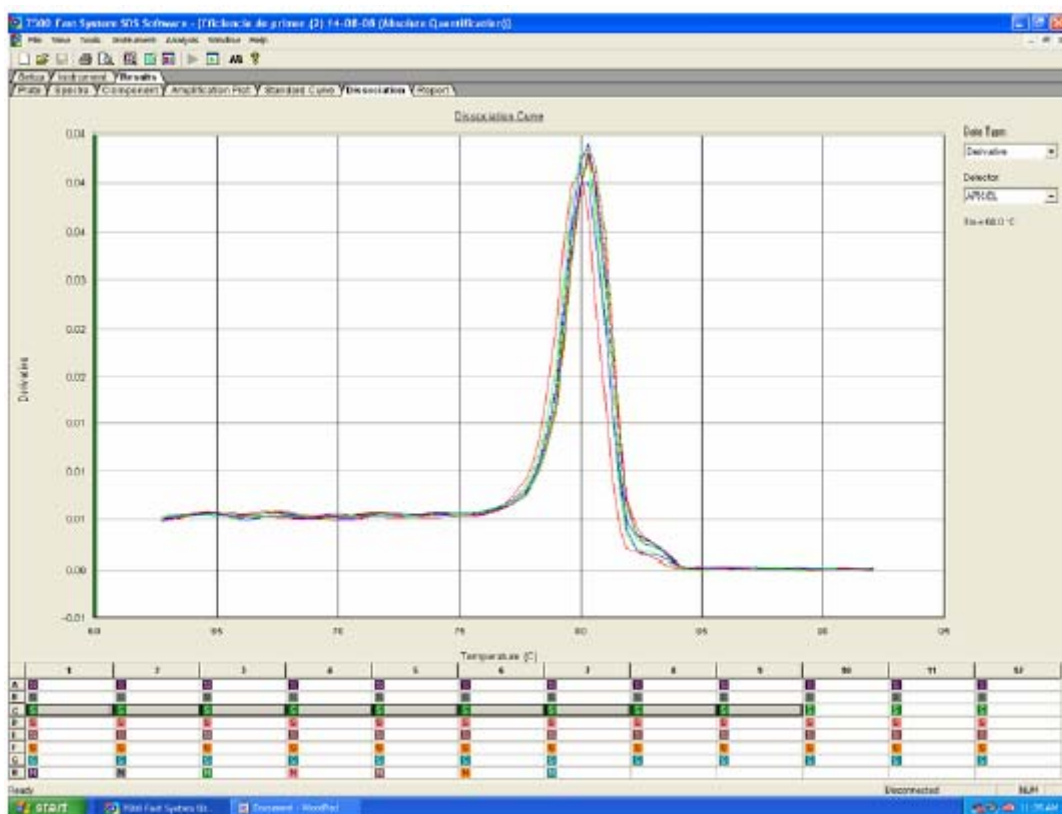


Figura 9 – Curva de dissociação do gene ascorbato peroxidase cloroplasto (APXCL).

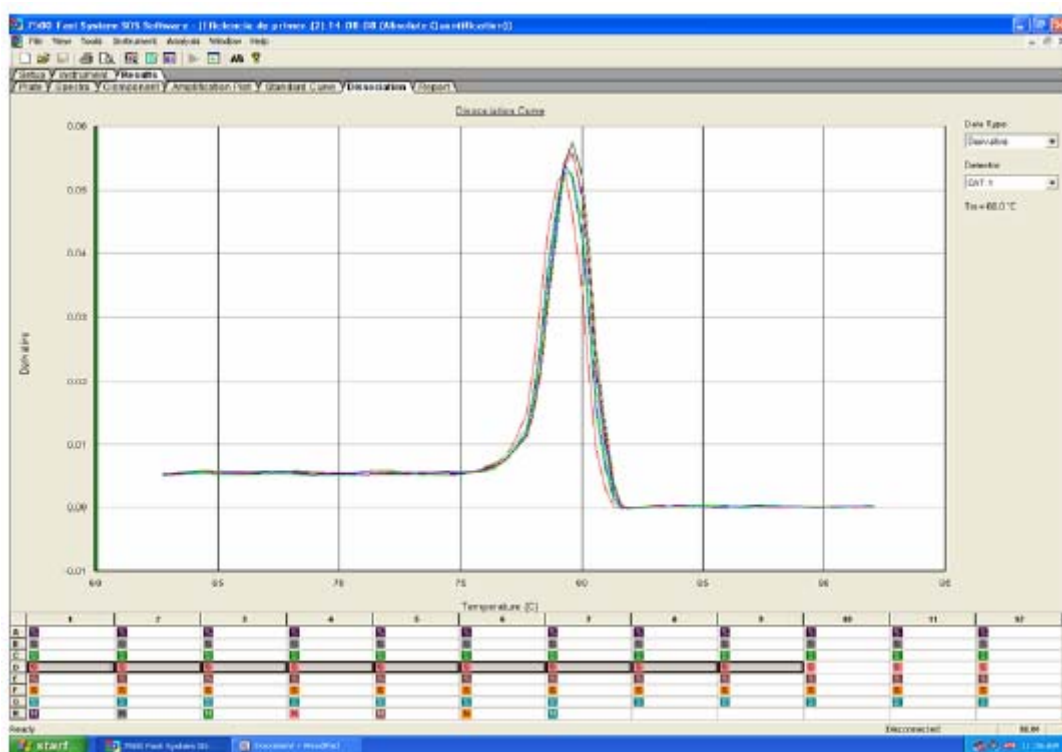


Figura 10 – Curva de dissociação do gene catalase 1 (CAT1).

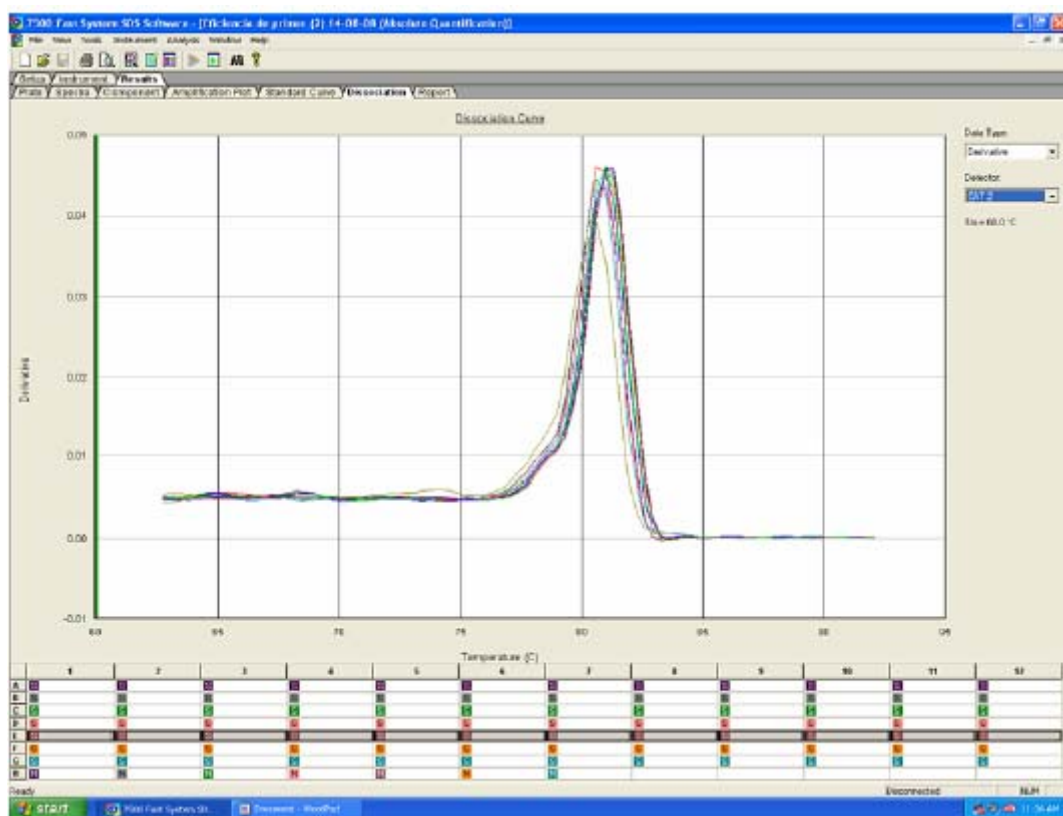


Figura 11 – Curva de dissociação do gene catalase isoforma 2 (CAT2).

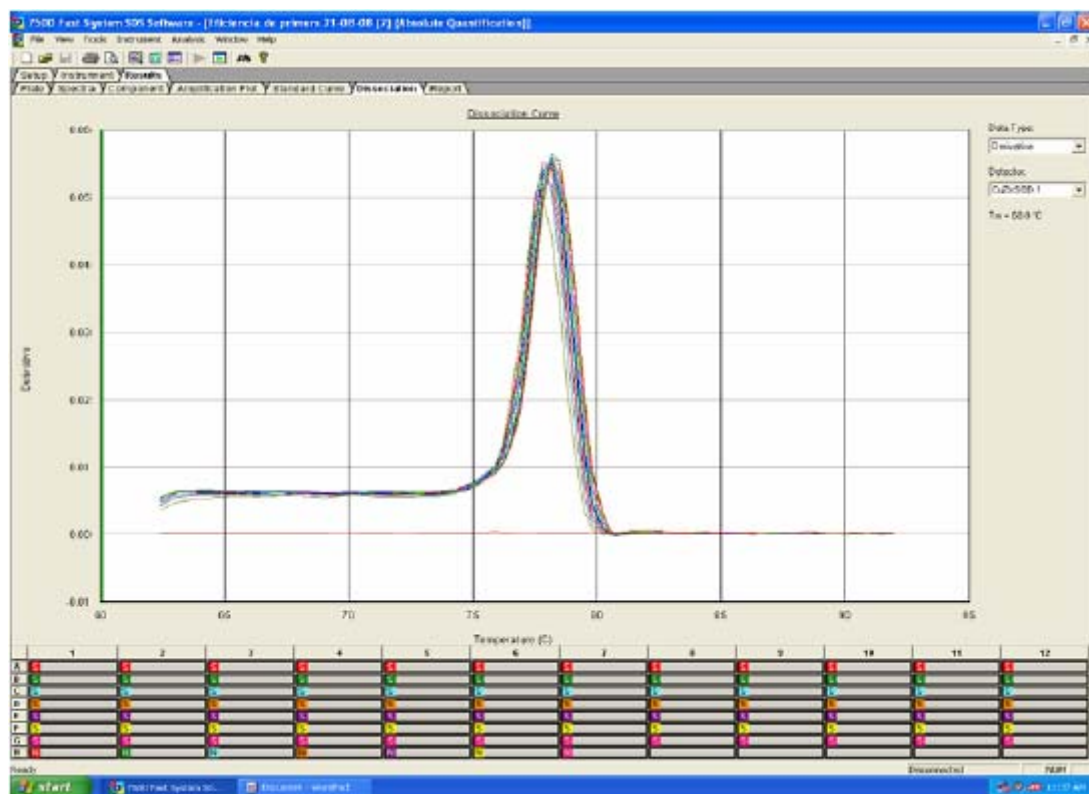


Figura 12 – Curva de dissociação do gene CuZn superóxido dismutase isoforma 1 (CuZnSOD1).

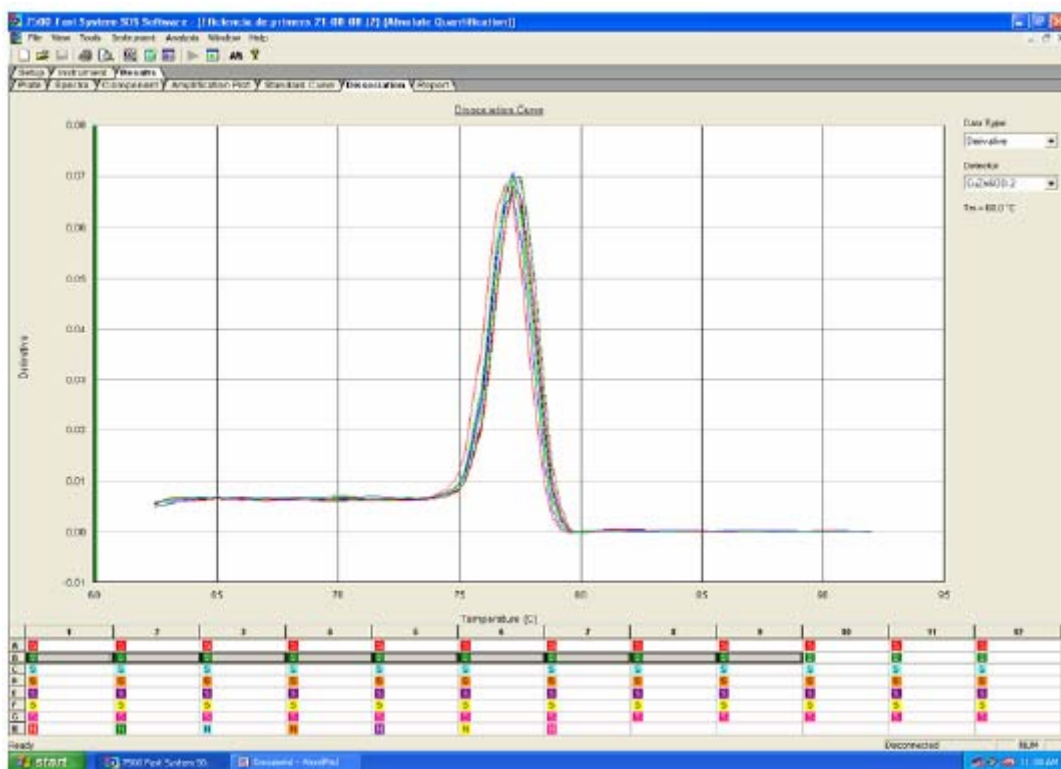


Figura 13 – Curva de dissociação do gene CuZn superóxido dismutase isoforma 2 (*CuZnSOD2*).

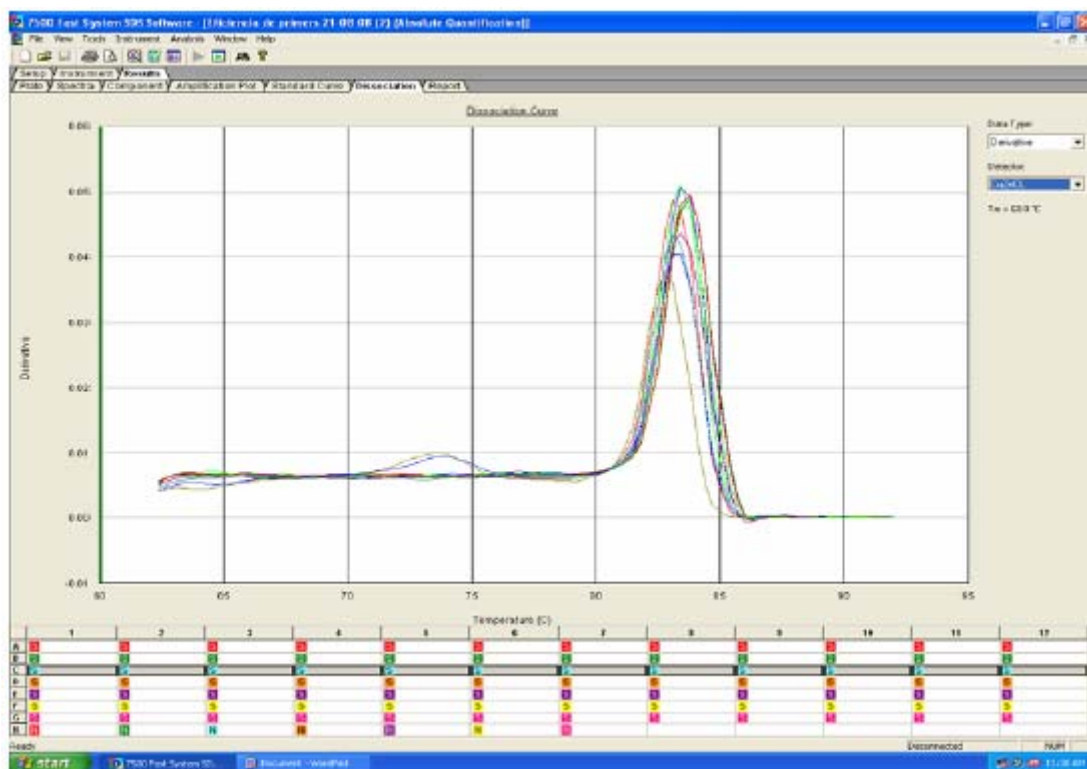


Figura 14 – Curva de dissociação do gene CuZn superóxido dismutase isoforma cloroplasto (*CuZnSODCL*).

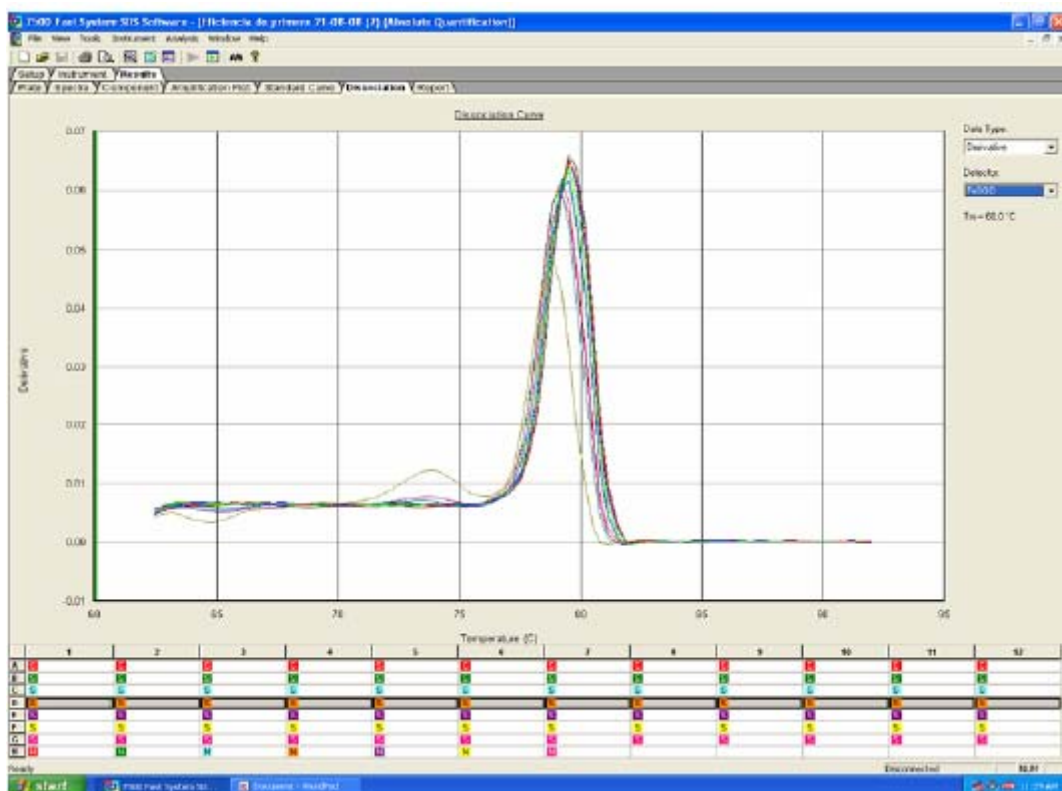


Figura 15 – Curva de dissociação do gene Fe superóxido dismutase (*FeSOD*).

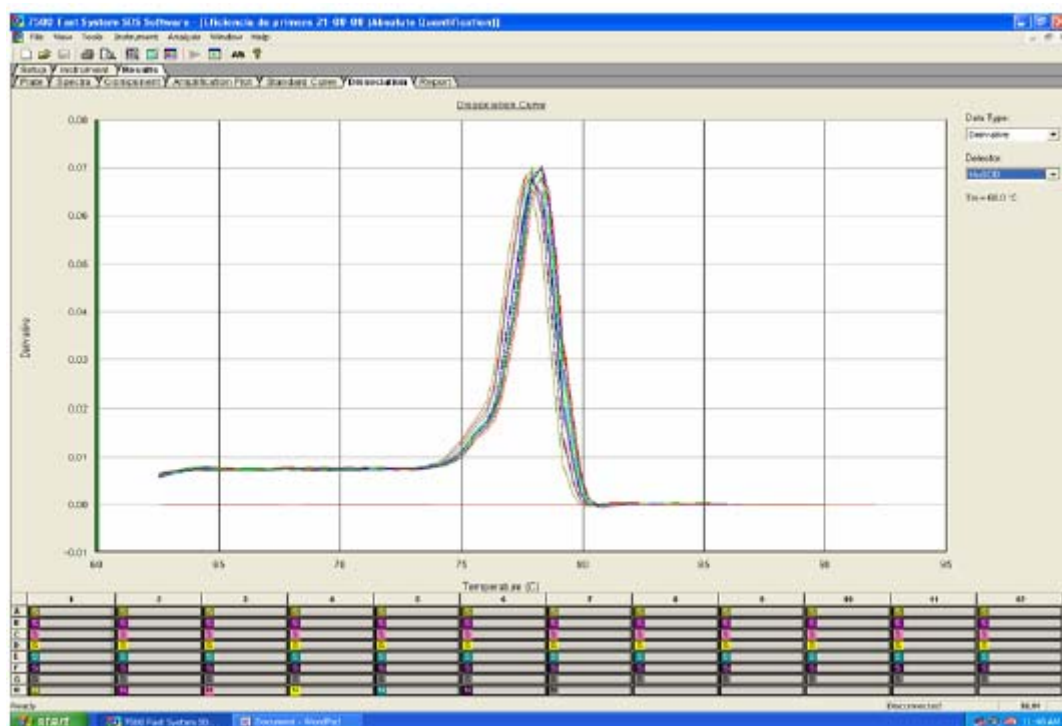


Figura 16 – Curva de dissociação do gene Mn superóxido dismutase (*MnSOD*).

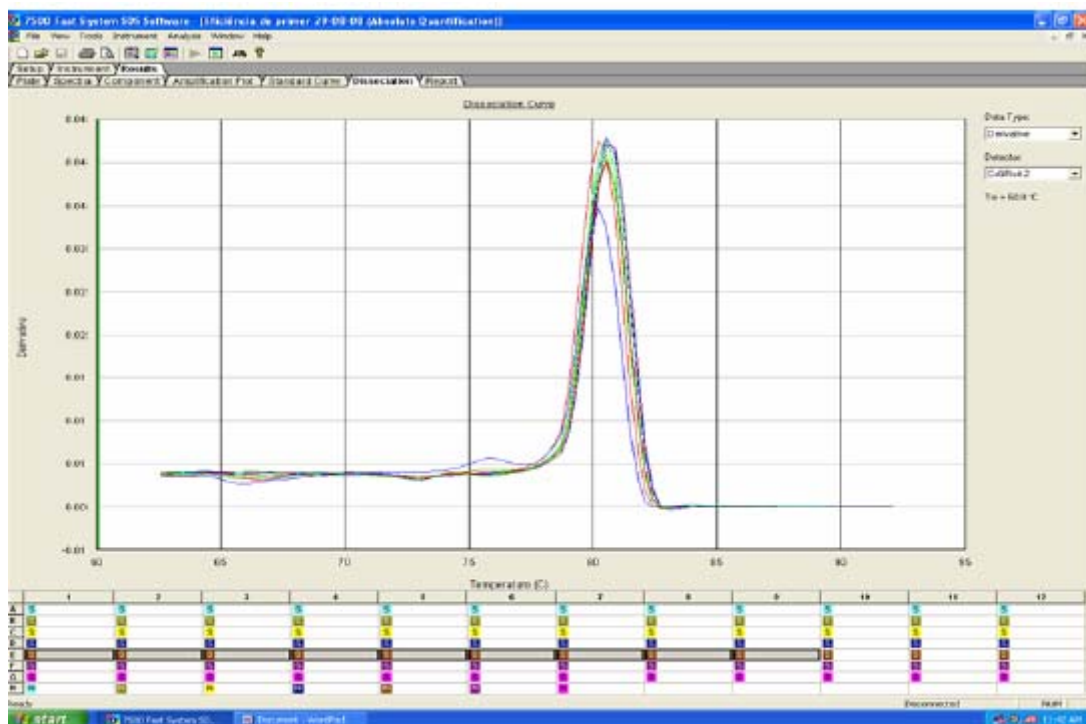


Figura 17 – Curva de dissociação do gene glutationa redutase citosólica (GR).

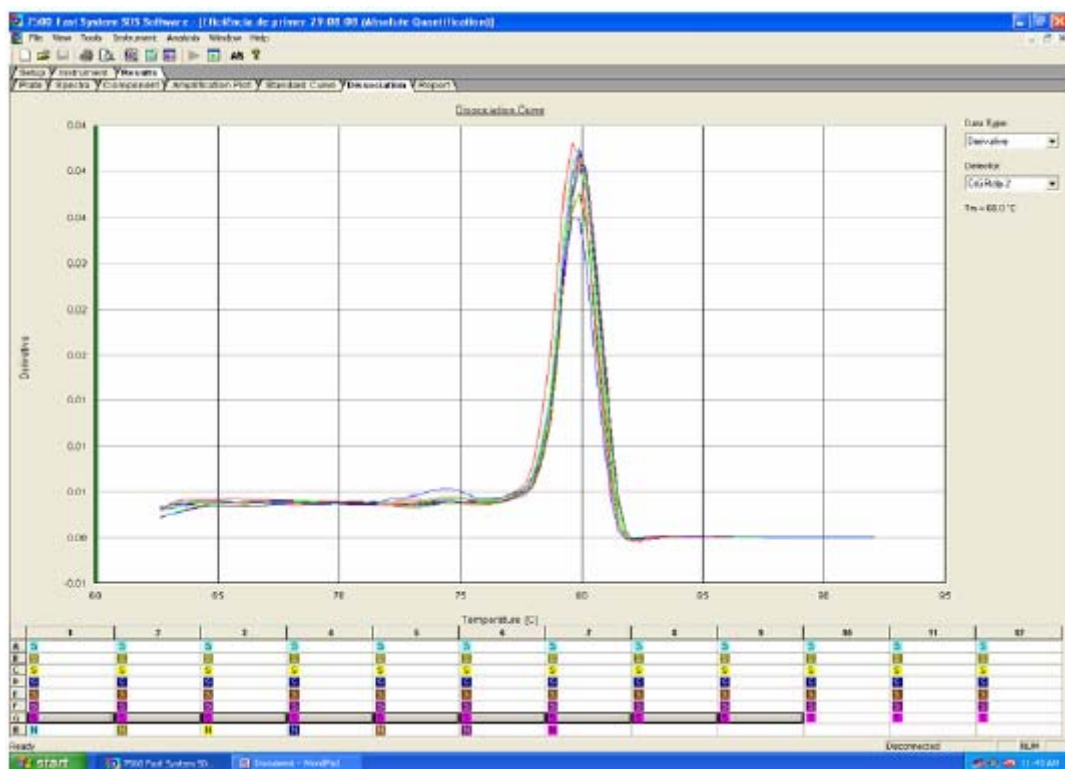


Figura 18 – Curva de dissociação do gene glutationa redutase cloroplasto (GRCL).

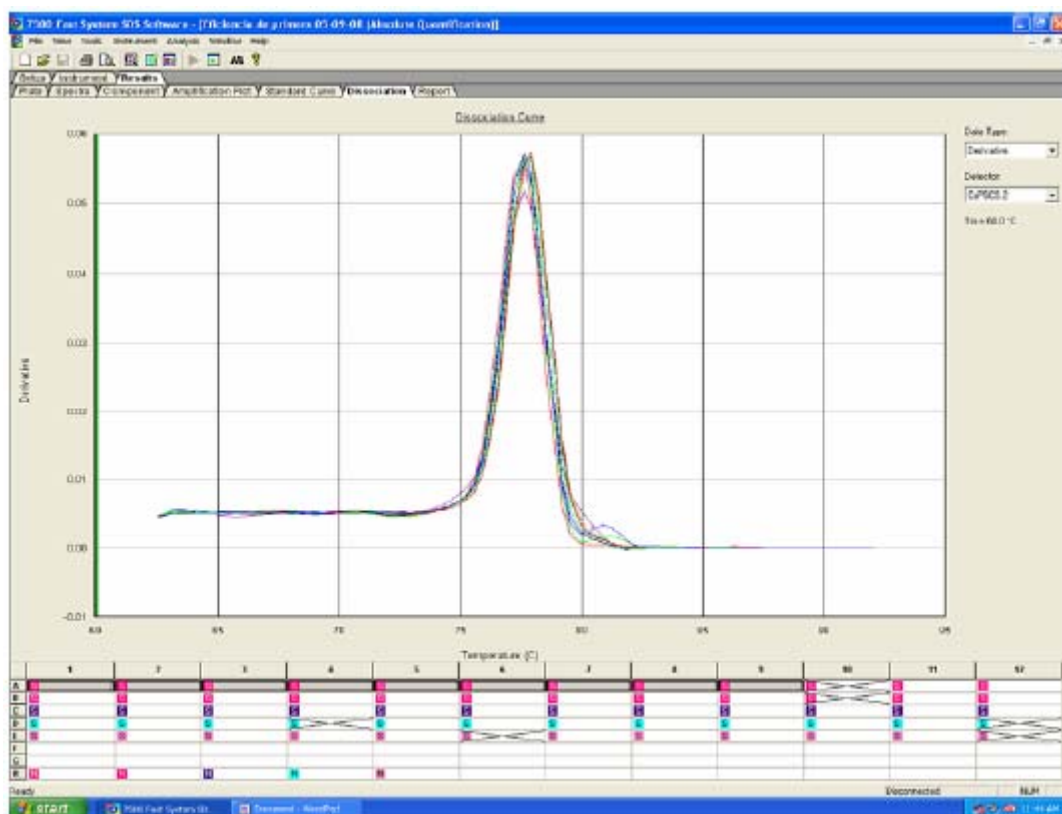


Figura 19 – Curva de dissociação do gene P5CS nativo (*CsP5CS*).

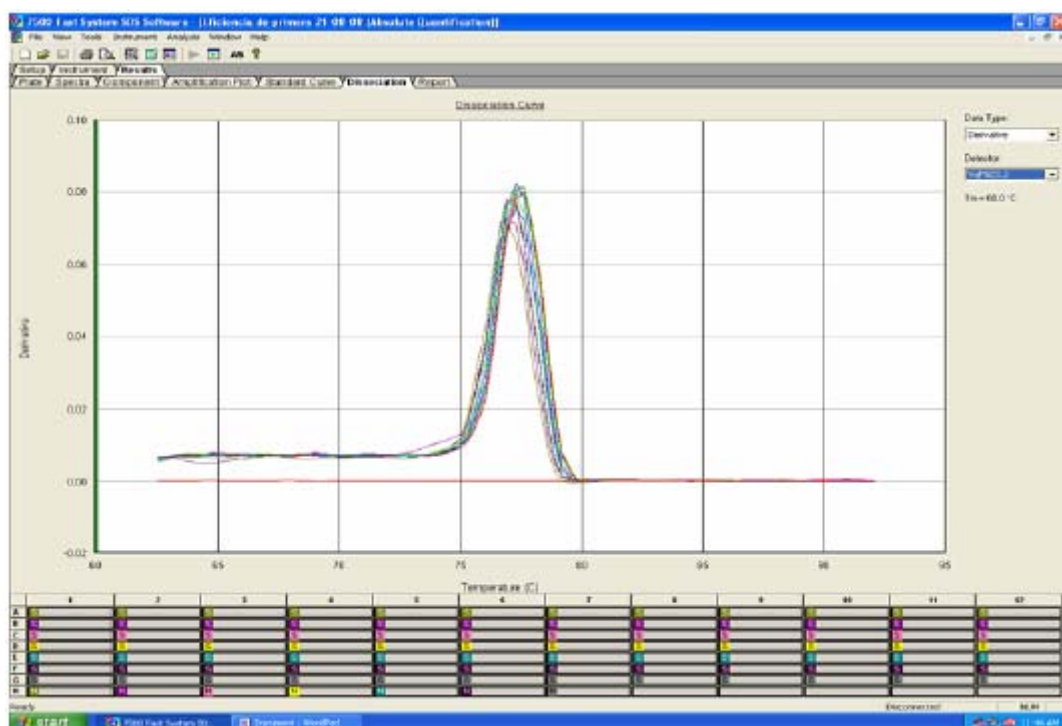


Figura 20 – Curva de dissociação do gene P5CS transgene (*P5CSF129A*).

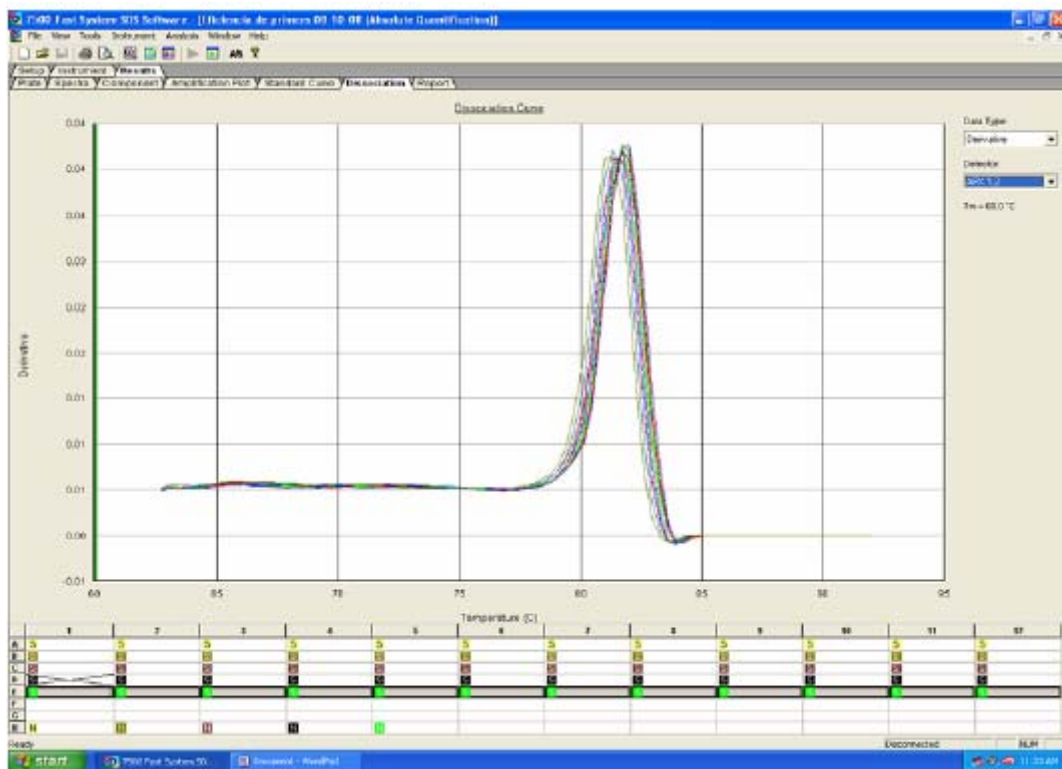


Figura 21 – Curva de dissociação do gene fator de alongamento 1  $\alpha$  (*EF1 $\alpha$* ).