

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS  
ALIMENTOS**

Vanessa Stahl Hermes

**REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DA SÍNTESE DE  
GLUTATIONA EM FOLHAS DE MILHO E DE FLAVONOIDES  
EM FRUTOS DE PIMENTA**

Florianópolis  
2014



Vanessa Stahl Hermes

**REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DA SÍNTESE DE  
GLUTATIONA EM FOLHAS DE MILHO E DE FLAVONOIDES  
EM FRUTOS DE PIMENTA**

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciência dos  
Alimentos da Universidade Federal  
de Santa Catarina para obtenção do  
título de Doutora em Ciência dos  
Alimentos

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana  
Carolina Maisonnave Arisi.

Florianópolis  
2014

Hermes, Vanessa Stahl  
REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DA SÍNTESE DE GLUTATIONA EM  
FOLHAS DE MILHO E DE FLAVONOIDES EM FRUTOS DE PIMENTA /  
Vanessa Stahl Hermes ; orientadora, Ana Carolina  
Maisonnave Arisi - Florianópolis, SC, 2014.  
149 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Biologia Molecular de  
Alimentos . 3. Análise de expressão gênica. 4.  
Flavonoides. 5. Glutathione. I. Arisi, Ana Carolina  
Maisonnave. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III.  
Título.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar os meus caminhos e me permitir mais essa conquista.

Aos meus pais, Nice e Alemão, Tata e Tio, meu irmão e cunhada, Fernando e Andrea, por todo apoio e empenho para que tudo isso fosse possível; pela compreensão, carinho e as palavras de conforto e encorajamento. Os resultados estão sendo colhidos e são de todos vocês também.

Ao meu amor, Vítor S. Poletto, por me acompanhar nas noites em claro na finalização deste trabalho; por todo apoio e incentivo, amor, atenção e compreensão em todos os momentos e, principalmente, por ter sido o meu melhor amigo no período do doutorado sanduíche.

À professora Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi, pela orientação e por acreditar no meu potencial para desenvolver esse trabalho.

Aos colegas do laboratório que se tornaram verdadeiros amigos: Fernanda P. Amaral, Pâmela Dallasta, Diana Treml, Tomás P. Pereira, Pedro A. Valentim, Gustavo Venturelli, Fábio Brod, Carla S. Mello e Geisi M. Bálamo, Andréia Zílio Dinon; e as nossas meninas e braços direitos: Kelly B. Anacleto, Gabriela B. Rossi, Jéssica C. F. Bueno, Mirella Scariot e Joana L. Bischoff. Esse trabalho não existiria sem vocês!

Aos amigos que ganhei na Holanda e que foram fundamentais durante o período do doutorado sanduíche: Juracy Lins, Roberta Mariot, Renake Teixeira, Carlos Alho, Victor Reiner, Lilian Abreu, Daniel Ribeiro, Cristiane Guimarães, Sara Longhi, Marine Paupiere, Cristina Machado, Tomás Micka, Maria Martorana e Tereza Vozábová. Eu os levarei para sempre comigo!

As minhas queirdas amigas Frederike M. Mette, Paula F. Butzen, Márcia K. Rodrigues, Gabriela K. Silva e Luciana O. Lima, que estiveram sempre ao meu lado, mesmo de longe, me trazendo carinho, apoio, incentivo e aconchego. Os e-mails, mensagens, cartas e/ou recados, quase que diários, foram de fundamental importância nessa conquista.

Aos demais amigos e familiares por entenderem minha ausência, por estarem sempre torcendo pelas minhas vitórias e pela força que sempre me deram na busca das minhas realizações.

A todos os colegas da Pós Graduação, em especial a Amanda Bagolin, Juliana Lorenz e Eunice Ilha; bem como professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão de bolsa de estudos.

Ao projeto de cooperação internacional CAPES/Wageningen n. 005/09, ao Instituto Plant Research International da Wageningen University and Research centre, que possibilitaram a realização do doutorado sanduíche na Holanda. Em especial ao Dr. Arnaud Bovy, que supervisionou, apoiou e ensinou muito no desenvolvimento da pesquisa naquela universidade, bem como a todo seu grupo de pesquisa.

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

Mas existe verdadeiramente outro rumo? Na  
verdade, só existe a direção que tomamos. O  
que poderia ter sido já não conta.  
Mario Benedetti





**HERMES, V.S. Regulação transcricional da síntese de glutathiona em folhas de milho e de flavonoides em frutos de pimenta.** 2014. 149p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## **RESUMO**

Compostos bioativos com propriedades antioxidantes, tais como flavonoides e glutathiona, agem como tampões redoxes, interagindo com numerosos componentes celulares. Este trabalho tem por objetivo avaliar a regulação transcricional por óxido nítrico da via de biossíntese de glutathiona em folhas de milho e elucidar a regulação molecular da via de síntese de flavonoides em frutos de pimenta através da análise de QTL. No primeiro estudo a apocinina foi utilizada como um indutor da síntese de óxido nítrico em folhas de duas cultivares de milho (*Zea mays* L.), SHS 3031 e DKB 240. Os níveis de transcritos dos genes codificadores de  $\gamma$ -glutamilmcisteína sintetase ( *$\gamma$ -ecs*), glutathiona sintetase (*gshs*), chalcone sintase (*chs*), flavanona 3- $\beta$ -hidroxilase (*fht1*), glutathiona S-transferase (*gst23*), ascorbato peroxidase (*apx1*, *apx2*), catalase (*cat1*, *cat3*) e superóxido dismutase (*sod2*) foram quantificados e a presença de NO foi detectada por microscopia de fluorescência. Não foi observado aumento na fluorescência nas folhas da variedade DKB 240 tratadas com apocinina, entretanto as folhas de SHS 3031 mostraram maior intensidade de fluorescência após 6 e 12 horas de tratamento. Já em relação aos níveis de transcritos analisados, foi observado que a transcrição de  *$\gamma$ -ecs*, *apx1*, *cat1* e *sod2* aumentou 24 h após o tratamento com apocinina nas folhas da variedade SHS 3031. Observou-se que o óxido nítrico pode regular a transcrição de genes da via de síntese da glutathiona e de enzimas antioxidantes em folhas de milho. No segundo estudo foi realizado o mapeamento genético de uma população F2 segregante derivada do cruzamento entre *Capsicum annuum* AC1979 (acesso nº 19) e *Capsicum chinense* seleção nº 4661 (acesso nº 18), onde foram encontrados 279 mQTLs, sendo dois hotspots de mQTL no cromossomo 9. A confirmação dos mQTLs utilizando cinco marcadores de genes candidatos dos flavonóides e os seus dados de expressão (eQTLs) indicou o fator de transcrição *Ca-MYB12* no cromossomo 1 e o gene que codifica a flavona sintase (FS-2) no cromossomo 6, como os prováveis genes causadores da variação da chalcona naringenina e de flavona-C-glicosídeo, respectivamente. A combinação do perfil metabólico com a análise de QTL forneceu

informações sobre a regulação molecular, as regiões genômicas e genes importantes da via de síntese dos flavonoides e outros metabólitos, o que poderá contribuir em estratégias de melhoramento para otimizar o conteúdo de metabólitos específicos em frutos de pimenta.

**Palavras-chave:** antioxidantes, flavonoides, glutathione, milho, pimenta.

HERMES, V.S. **Transcriptional regulation of the glutathione synthesis in maize leaves and the flavonoids synthesis in pepper fruits.** 2014. 149p. Thesis (Ph.D. in Food Science), Program of Post Graduation in Food Science, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## ABSTRACT

Bioactive compounds with antioxidant properties, such as flavonoids and glutathione, act as redox buffers interacting with numerous cellular components. This work aims to evaluate the transcriptional regulation of the glutathione biosynthesis pathway genes by nitric oxide in maize leaves and elucidate the molecular regulation of the flavonoids biosynthesis pathway in pepper fruits by QTL analysis. In the first study the apocynin was used as an inducer of nitric oxide synthesis in leaves of two maize (*Zea mays* L.) cultivars, DKB 240 and SHS 3031. The transcripts levels of the genes encoding  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( *$\gamma$ -ecs*), glutathione sintetase (*gshs*), chalcone synthase (*chs*), flavanone 3- $\beta$ -hidroxilase (*fht1*), glutathione S-transferase (*gst23*), ascorbate peroxidase (*apx1*, *apx2*), catalase (*cat1*, *cat3*) and superoxide dismutase (*sod2*) were quantified and the presence of NO was detected by fluorescence microscopy. No increase in fluorescence was observed in the leaves of the maize variety DKB 240 after the treatment with apocynin. However, the SHS 3031 leaves showed an higher fluorescence intensity after 6 and 12 hours of apocynin treatment. In relation to the transcript levels it was observed that the transcription of  *$\gamma$ -ecs*, *apx1*, *cat1* and *sod2* increased 24 h after apocynin treatment in leaves of SHS 3031. It was noted that the nitric oxide can regulate the transcription of the glutathione biosynthesis genes and in the antioxidant enzymes genes in maize leaves. In the second study it was conducted a genetic mapping of a F2 segregating population derived from a cross between *Capsicum annum* AC1979 (access 19) and *Capsicum chinense* selection No. 4661 (access No. 18), where 279 mQTLs were found, with two mQTLs hotspots on chromosome 9. Confirmation of flavonoid mQTLs using a set of five flavonoid candidate gene markers and their corresponding expression data (e QTLs) indicated the Ca-MYB12 transcription factor gene on chromosome 1 and the gene encoding flavone synthase (FS-2) on chromosome 6 as likely causative genes determining the variation in naringenin chalcone and flavone C-glycosides, respectively. The combination of large-scale metabolite profiling and QTL analysis provided valuable insight into the genomic

regions and important genes for the production of secondary metabolites, which may influence the breeding strategies aimed at optimising the content of specific metabolites in pepper fruit.

**Keywords:** antioxidants, flavonoids, glutathione, maize, pepper

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Capítulo 1

**Figura 1.1** Estrutura geral e sistema de numeração de flavonoides.....33

**Figura 1.2** Estrutura das principais classes de flavonoides.....34

**Figura 1.3** Início da biossíntese de flavonoides, influência da fenilalanina amônia liase (PAL). CHI, chalcona isomerase; CHS, chalcona sintase; C4H, cinamato 4-hidroxilase; 4CL, 4-cumaril CoA-ligase.....35

**Figura 1.4** (A) Equema da síntese dos flavonoides em plantas. CHS, chalcona sintase; CHI, chalcona isomerase; F3H, flavanona 3-hidroxilase; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilase; F3'5'H, flavonoide 3',5'-hidroxilase; DFR, dihidroflavonol redutase; LDOX, leucoantocianidina oxidase; UFGT, UDP-glicose flavonoide 3-O-glicosil transferase; MT, metiltransferase; PAs, proantocianidinas; LAR, leucoantocianidina redutase; ANR, antocianidina redutase; STS, estilbeno sintase. Os números próximo aos grupos dos flavonoides estão relacionaods com as estruturas químicas mostradas em (B). (B) Estruturas químicas dos principais grupos de flavonoides. ....37

**Figura 1.5** Representação esquemática da rota da biossíntese da glutatona. ADP, adenosina difosfato; ATP, adenosina trifosfato; Pi, fosfato ionizado.....41

**Figura 1.6** Biossíntese de glutatona e processos de interação em células vegetais. GR, glutatona redutase; GSH, glutatona reduzida; GSH-S, glutatona sintetase; GSNO, nitroso glutatona; GSSG, glutatona oxidada; GSTs, glutatona transferases.....43

**Figura 1.7** Representação das funções de sinalização do NO. Linhas pontilhadas representam funções potenciais. CHS, chalcona sintase; CA, ácido cinâmico; Ca<sup>2+</sup>, influxo de cácio; cADPR, adenosina difosfato-ribose cíclica; cGMP, guanosina 3', 5'-monofosfato cíclica; MAPK, proteína quinase ativadora de mitogênese; PAL, fenilalanina amônia liase; PHE, fenilalanina; PR, proteínas relacionadas a patogênese; SA, ácido salicílico; GSH, glautatona GSNO, nitrosoglutationa.....47

**Figura 1.8** Representação da inibição da NADPH oxidase pela apocinina, inibindo a formação de superóxido ( $O_2^-$ ) e, conseqüentemente, de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), deixando óxido nítrico (NO) livre.....48

**Figura 1.9** Representação da amplificação por PCR em tempo real utilizando SYBR *Green*. (A) SYBR *Green* livre na solução não emite fluorescência. (B) SYBR *Green* ligado à dupla fita de DNA, emite fluorescência.....51

**Figura 1.10** Gráfico representando curvas de dissociação térmica (*melting*) de três diferentes produtos de amplificação (linhas de diferentes cores).....51

**Figura 1.11** Gráfico da amplificação de produtos de PCR em tempo real ( $\Delta Rn$  versus número de ciclos) apresentando as diferentes fases da reação (Lag, exponencial ou Log e platô), bem como o ponto de determinação do  $C_T$ .....52

**Figura 1.12** Gráfico representando curvas de validação de um gene de referência (linha vermelha) e um gene alvo (linha cinza) com suas respectivas equações,  $R^2$  e eficiências.....54

**Figura 1.13** Esquema representando a construção de um mapa de marcadores genéticos a partir de uma população segregante F2 (amostras de 1 a 20 na genotipagem dos marcadores E, F, G e H). Alelos da linhagem parental P1 estão simbolizados como 'A' e da linhagem parental P2, como 'B'.....57

## Capítulo 2

**Figure 2.1** NO visualization by fluorescence microscopy in transversal sections of *Zea mays* DKB 240 leaves (midrib) loaded with DAF-FM DA. Leaf samples treated for 0, 2, 6, and 12 h with water ( $H_2O$ ), apocynin (APO), APO plus cPTIO. *Scale bar* 100  $\mu m$ .....67

**Figure 2.2** NO visualization by fluorescence microscopy in transversal sections of *Zea mays* SHS 3031 leaves (midrib) loaded with DAF-FM DA. Leaf samples treated for 0, 2, 6, and 12 h with water ( $H_2O$ ), apocynin (APO), APO plus cPTIO. *Scale bar* 100  $\mu m$ .....69

### Capítulo 3

**Figure 3.1** Venn diagram of 542 semi-polar metabolites detected in ripe fruits of two parental accessions: P1=*C. annuum* AC1979 (no. 19) and P2=*C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18), F1 and F2 plants. Values in circles and intersections illustrated the number of metabolites accumulating in each of the sample groups. A metabolite was denoted as “detected” in a given sample when the mass intensity level of its centroid mass peak was above the local noise. According to the Metalign output the local noise was set at a mass intensity of 37.....90

**Figure 3.2** Heat map of 43 putative semi-polar metabolites which accumulated in ripe fruits of the parental accessions: *C. annuum* AC1979 (no. 19) and *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18), and/or the two F1 plants. A color-coded matrix represents values of the metabolite intensity in each genotype, which has been log<sub>2</sub> transformed and mean-centered.....91

**Figure 3.3** Principal component and hierarchical cluster analysis of F2 plants, two F1 plants and two parental accessions. **a**, Principal component analysis. P1=*C. annuum* AC1979 (no. 19) and P2=*C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18), based on 542 semi-polar metabolite profiles in ripe fruits. **b**, Hierarchical cluster analysis. Heat map of 542 metabolites in ripe fruits of F2, two F1 and two parental accession plants, *C. annuum* AC1979 (no. 19) and *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18). A color-coded matrix represents the value of the metabolite intensity in pepper samples, which has been log<sub>2</sub> transformed and mean-centered. The alphabets (A-F) represent metabolite clusters. Characteristics of the underlying metabolites are presented in Supplemental Table 2.....93

**Figure 3.4** Overview of mQTLs in pepper fruit. **a**, Frequency distribution of total mQTLs detected at each marker position on pepper chromosomes, which is represented by red bars. The dotted vertical lines represent the chromosomal borders. **b**, mQTLs likelihood map on chromosome 9.....95

**Figure 3.5** Flavonoid mQTLs and flavonoid candidate gene eQTLs on pepper chromosomes. Light blue boxes indicate flavonoid mQTLs, the yellow box indicates the *Ca-MYB12* transcription factor eQTL and green boxes indicate eQTLs of flavonoid structural candidate genes.

Boxes with grey dotted outlines indicate flavone *C*-glycoside mQTLs and an *FS*-2 eQTL with significant LOD scores (mQTL = >3.7; eQTL = >3.6) at the *CHI*-4 locus, but these are not considered as a separate locus for those metabolites, since they are overlapping with the *FS*-2 QTL interval. Abbreviations: *CHS*, chalcone synthase; *CHI*, chalcone isomerase; *F3H*, flavanone-3-hydroxylase; *FLS*, flavonol synthase; *F3'H*, flavonoid-3'-hydroxylase; *FS*, flavone synthase.....100

Supplemental Figure 3.1 A crossing scheme to develop F2 plants from *C. annuum* AC1979 (no. 19) and *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18). Two homogenous F1 plants were obtained by crossing two pepper accessions. Each of F1-plants was self-pollinated to produce F2 progeny. The representation of plants shown in the scheme is not in true scaled.....105

Supplemental Figure 3.2 Variation in fruit morphological characters of: a, *C. annuum* AC1979 (no. 19); b, *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18); c, F1 plants; and d, F2 plants.....106

Supplemental Figure 3.3 MSn fragmentation pattern of Capsianoside VIII and IX using LTQ-Orbitrap FTMS in negative ionization mode.....107



## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

**Table 2.1** Primer forward (F) and reverse (R) sequences and concentrations used in qRT-PCR analysis for *Zea mays* transcript quantification.....66

**Table 2.2** Relative expression of  $\gamma$ -ecs, gshs, chs, act, fht1, and gst23 in *Zea mays* DKB 240 leaves. Leaf samples of 10-d-old seedlings were treated for 2, 6, 12, and 24 h with H<sub>2</sub>O, APO, and APO plus cPTIO. Relative content of transcripts were calculated by qRT-PCR using the  $\Delta\Delta$ CT method and  $\alpha$ -tubulin as a reference gene. Means  $\pm$  SD, n = 9. Values followed by different letters in the column are significantly different at P < 0.05 according to the Kruskal-Wallis test.....70

**Table 2.3** Relative expression of  $\gamma$ -ecs, gshs, chs, act, fht1, and gst23 in *Zea mays* SHS 3031 leaves. Leaf samples of 10-d-old seedlings were treated for 2, 6, 12, and 24 h with H<sub>2</sub>O, APO, and APO plus cPTIO. Relative content of transcripts were calculated by qRT-PCR using the  $\Delta\Delta$ CT method and  $\alpha$ -tubulin as a reference gene. Means  $\pm$  SD, n = 9. Values followed by different letters in the column are significantly different at P < 0.05 according to the Kruskal-Wallis test.....71

**Table 2.4** Relative expression of apx1, apx2, cat1, cat3, and sod2 in *Zea mays* SHS 3031 leaves. Leaf samples of 10-d-old seedlings were treated for 2, 6, 12, and 24 h with H<sub>2</sub>O, APO, APO plus cPTIO. Relative content of transcripts were calculated by qRT-PCR using the  $\Delta\Delta$ CT method and  $\alpha$ -tubulin as a reference gene. Means  $\pm$  SD, n = 9. Values followed by different letters in the column are significantly different at P < 0.05 according to the Kruskal-Wallis test.....73

### Capítulo 3

Supplemental Table 3.1 (A) Flavonoid candidate genes and primers for SNPs.....	109
Supplemental Table 3.1 (B) Flavonoid candidate genes and primers for SNPs .....	111
Supplemental Table 3.2 Semi-polar metabolite composition and mQTLs of F2 population.....	112
Supplemental Table 3.3 Position of flavonoid SNP markers on genetic map in pepper.....	112
Supplemental Table 3.4 Putative metabolites associated with a quantitative trait locus.....	119
Supplemental Table 3.5 Flavonoid QTLs and flavonoid candidate gene expression QTLs in pepper.....	122
Supplemental Table 3.6 Pearson correlation analysis of flavone C-glycosides.....	125

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP – Polimorfismo de fragmento amplificado, do inglês *Amplified Fragment Length Polymorphism*

ANR – Antocianidina redutase

AOX – Oxidase alternativa

APO – Apocinina

APX – Ascorbato peroxidase

*apx* – Gene que codifica ascorbato peroxidase

CA – Ácido cinâmico

cADPR – Adenosina difosfato-ribose cíclica

*CaMYB12* – Gene do fator de transcrição MYB12 em pimenta

CAT – Catalase

*cat* – Gene que codifica a catalase

cDNA – DNA complementar

cGMP – Guanosina 3', 5'- monofosfato cíclica

CHI – Chalcona isomerase

*chi* – Gene que codifica chalcona isomerase

CHS – Chalcona sintase

*chs* – Gene que codifica chalcona sintase

cPTIO - 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-oxil-3-óxido

DAF-FM DA - 4,5-diaminofluoresceína diacetato

DFR – Dihidroflavonol 4-redutase

DHK – Dihidrokanferol

DHQ - Dihidroquercetina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

eQTL – QTL de expressão gênica

F3'5'H – Flavonide 3',5'-hidroxilase

F3'H – Flavonide 3'-hidroxilase

F3H – Flavanona 3-hidroxilase

*fht* – Gene que codifica flavanona 3-hidroxilase

FLS – Flavonol sintase

FS – Flavona sintase

GPx – Glutationa peroxidase

GR – Glutationa redutase

GSH – Glutationa

GSH-S – Glutationa sintetase

*gshs* – Gene que codifica glutationa sintetase

GSNO - Nitrosoglutationa

GSSG – Glutationa dissulfeto (oxidada)

GST – Glutationa S-transferase

*gst* – Gene que codifica glutationa S-transferase

HCA – Análise de agrupamento hierárquico, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

JA – Ácido jasmônico (jasmonato)

LAR – Leucoantocianidina redutase

LC-QTOF-MS – Espectrometria de massa de alta resolução com tempos de voo quádruplo, do inglês *Quadrupole Time of Flight High Resolution MS*

LDOX – Leucoantocianidina oxidase

LOD – Limite de detecção, do inglês *Log of Odds*

MAPK – Proteína quinase ativadora de mitogênese

mQTL – QTL de metabólito

MS – Espectrometria de massas, do inglês *Mass Spectrometry*

MT – Metiltransferase

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase

NO – Óxido nítrico

NOX – NADPH-oxidase

O<sub>2</sub> – Oxigênio

O<sup>2-</sup> – Ânion superóxido

OH<sup>-</sup> – Hidroxila

ONOO<sup>-</sup> – Peroxinitrito

PA – Proantocianidinas (taninos)

PAL – Fenilalanina amônia liase

PCA – Análise de componentes principais, do inglês *Principal Components Analysis*

PHE – Fenilalanina

POX – Peroxidase

PPO – Polifenol oxidase

PR-1 – Proteína relacionada à patogênese

qRT-PCR – Transcrição reversa quantitativa – Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

QTL – Região de característica quantitativa, do inglês *Quantitative Trait Locus*

RNA – Ácido ribonucleico

RNS – Espécies reativas de nitrogênio, do inglês *Reactive Nitrogen Species*

ROS – Espécies reativas de oxigênio, do inglês *Reactive Oxygen Species*

RSNO – S-nitrotiois

SNP – Nitroprussiato de sódio; e também polimorfismo de um único nucleotídeo, do inglês *Single Nucleotide Polimorfism*

SOD – Superóxido dismutase

*sod* – Gene que codifica a superóxido dismutase

SSR – Sequência de repetição simples, do inglês *Simple Sequence Repeat*

STS – Estilbeno sintase

UDP – Uridina difosfato

UFGT – UDP-glicose flavonoide 3-O-glicosil transferase

$\gamma$ -EC –  $\gamma$ -glutamilmicisteína

$\gamma$ -ECS –  $\gamma$ -glutamilmicisteína sintetase

*$\gamma$ -ecs* - Gene que codifica  $\gamma$ -glutamilmicisteína sintetase



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	25
CAPÍTULO 1.....	29
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
1.1 <i>Antioxidantes</i> .....	29
1.1.1 <i>Flavonoides</i> .....	32
1.1.2 <i>Glutathiona</i> .....	40
1.2 <i>Óxido nítrico</i> .....	44
1.3 <i>Análise de expressão gênica</i> .....	49
1.4 <i>QTL</i> .....	55
CAPÍTULO 2.....	61
2. The regulation of transcription of genes related to oxidative stress and glutathione synthesis in <i>Zea mays</i> leaves by nitric oxide.....	62
2.1 <i>Introduction</i> .....	63
2.2 <i>Materials and methods</i> .....	64
2.3 <i>Results</i> .....	67
2.4 <i>Discussion</i> .....	72
CAPÍTULO 3.....	77
3. Genetic mapping of semi-olar metabolites in pepper fruits ( <i>Capsicum</i> sp.) – towards unravelling the molecular regulation of flavonoid QTLs.....	78
3.1 <i>Introduction</i> .....	81
3.2 <i>Materials and Methods</i> .....	83
3.2.1 <i>Plant Materials</i> .....	83
3.2.2 <i>Extraction and analysis of semi-polar metabolites</i> .....	84
3.2.3 <i>Metabolite data processing</i> .....	84
3.2.4 <i>Genetic linkage map construction and metabolic QTL mapping analysis</i> .....	85
3.2.5 <i>RNA extraction</i> .....	86
3.2.6 <i>Selection and isolation of pepper flavonoid candidate genes</i> .....	86

3.2.7 <i>Flavonoid gene expression. analysis</i> .....	87
3.2.8 <i>Detection of SNPs in flavonoid candidate genes and mapping of the genetic position of flavonoid SNP markers</i> .....	87
3.2.9 <i>Flavonoid QTL and flavonoide QTL analysis</i> .....	88
3.3 <i>Results</i> .....	88
3.3.1 <i>Phenotype of parental, F1 and F2 plants</i> .....	88
3.3.2 <i>Semi-polar metabolites in ripe fruits of parental, F1 and F2 plants</i> .....	88
3.3.3 <i>QTL anlysis of the F2 population</i> .....	94
3.4 <i>Discussion</i> .....	100
3.5 <i>Supplementary Materials</i> .....	105
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>126</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>128</b>



## INTRODUÇÃO

A relação entre saúde e ingestão de frutas e vegetais tem sido foco de muitas pesquisas científicas na tentativa de identificar os componentes específicos das plantas que proporcionam benefícios à saúde. Além de serem boas fontes de vitaminas, minerais e fibras, frutas e vegetais são também ricas fontes de compostos potencialmente bioativos, conhecidos como fitoquímicos. Os antioxidantes, por exemplo, são fitoquímicos abundantes em plantas e capazes de prevenir alguns processos nas células humanas envolvidos no desenvolvimento de câncer e doenças cardiovasculares (PALAFOX-CARLOS; AYALA-ZAVALA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2011).

O sistema antioxidante das plantas envolve uma ampla variedade de moléculas sequestradoras e/ou supressoras de radicais livres, tais como glutathione, vitaminas, flavonoides, carotenoides, entre outros metabólitos, que tornam os produtos naturais excelentes antioxidantes (GRUPTA; SHARMA, 2006). Os compostos fenólicos, incluindo os flavonoides, são amplamente distribuídos em plantas e têm mostrado exercer múltiplos efeitos biológicos além da atividade antioxidante pelo sequestro de radicais livres, como inibição de enzimas hidrolíticas e oxidativas e funções anti-inflamatórias e anticarcinogênicas em células humanas (MANDAL et al., 2009).

Embora a função mais conhecida dos flavonoides seja a formação de pigmentos, eles exercem também um papel importante na biologia das plantas participando na sinalização hormonal; absorção de raios UV e resposta a estresses bióticos e abióticos (SCHIJLEN et al., 2004; TAYLOR; GROTEWOLD, 2005; LEA et al., 2007).

Um fruto que representa uma rica fonte de flavonoides é o fruto da pimenta (*Capsicum*). Pertencentes à família Solanaceae, as pimentas destacam-se como importantes produtos do agronegócio brasileiro. Em razão da elevada capacidade de geração de emprego e renda, principalmente para os pequenos produtores, as pimentas posicionam-se dentro da agricultura brasileira como uma cultura de elevada importância socioeconômica, uma vez que seus frutos detêm amplas oportunidades de mercado, tanto na forma in natura como processada (EMBRAPA 2010).

Diferentes variedades de pimenta apresentam variações na composição e nos níveis de antioxidantes, em especial, de flavonoides, influenciados pelo genótipo, fatores de desenvolvimento e ambientais. Embora as vias de síntese de flavonoides estejam bem entendidas em

algumas espécies de plantas, o conhecimento detalhado da regulação da expressão gênica e de desenvolvimento dessa via em pimenta ainda é limitado (WAHYUNI et al., 2011).

Antioxidantes de baixa massa molecular, como ascorbato, glutationa e tocoferóis, são componentes bioativos que agem como tampões redox interagindo com numerosos componentes celulares nas plantas (ARISI et al., 1998, NOCTOR et al., 1998), fornecendo informações essenciais para manutenção da homeostase redox celular (FOYER, 2005). A glutationa é um composto abundante nos tecidos de planta, sendo a principal forma de armazenamento de enxofre e atuando como um potente detoxificante de xenobióticos. Juntamente com sua forma oxidada, a glutationa mantém o balanço redox celular (NOCTOR et al., 1998).

A fisiologia e a biologia molecular vegetal vêm estabelecendo as rotas metabólicas e analisando a regulação da expressão de genes que controlam a síntese de compostos bioativos em vegetais (LEPINIEC et al., 2006). Dessa maneira, o estudo de fatores que possam influenciar na expressão gênica de componentes envolvidos na via de síntese desses compostos com propriedades benéficas a saúde ganha maior importância.

Cultura que, por mais de um século, tem sido considerada um organismo modelo para a realização de pesquisas científicas na área biológica, o milho (*Zea mays* L.), pertencente à família Poaceae, possui importância por representar uma abundante fonte de alimentação humana e animal, por estar presente em muitos produtos industriais e por ser uma importante fonte de etanol. Possuindo fácil processamento, digestibilidade e baixo custo se comparado com outros cereais, o milho ainda constitui-se numa cultura de grande versatilidade, uma vez que pode ser implementada em zonas agroecológicas variadas (Fasoli *et al.*, 2009; Lawrence *et al.*, 2008). É importante ressaltar ainda, que o Brasil é considerado um dos grandes produtores de milho, obtendo na safra 2011/12, um recorde de aproximados 72,73 milhões de toneladas (Conab, 2012). Assim, o milho serve ao mesmo tempo como *commodity* e como planta-modelo para a pesquisa científica básica (Lawrence *et al.*, 2008).

Sendo o Brasil um dos principais produtores de alimentos do mundo, a presente tese de doutorado envolveu estudos com milho, importante cereal produzido no país, e frutos de pimenta, cultivo de grande relevância na economia familiar brasileira. Estes diferentes cultivos foram utilizados para análise de expressão de genes relacionados à síntese de compostos bioativos, conhecidos pelos seus

benefícios à saúde, incluindo a glutatona e os flavonoides, buscando promover o avanço do conhecimento científico e contribuir para a realização de pesquisas relevantes na área de ciência de alimentos.

Esta tese é apresentada em forma de capítulos, sendo que no Capítulo 1 será apresentada uma revisão bibliográfica sobre os antioxidantes presentes em plantas com suas classificações, funções e mecanismos de ação. Além disso, é apresentada uma descrição mais detalhada dos flavonoides, antioxidantes que têm sido foco de muitas pesquisas recentes, bem como da glutatona, que além da atividade antioxidante, é uma molécula essencial para o balanço redox celular. Estão descritas também as funções e interações do sinalizador celular óxido nítrico. Por fim, é apresentada uma descrição da análise de expressão gênica por PCR em tempo real, bem como de QTLs (do inglês, *quantitative trait locus*) e sua aplicação. Os seguintes capítulos são apresentados em formato de artigo científico.

No Capítulo 2 está apresentado o trabalho sobre a regulação por óxido nítrico da transcrição de genes relacionados ao estresse oxidativo e à síntese de glutatona em folhas de milho. O objetivo desse estudo foi investigar se o NO induzido por apocinina pode interferir na expressão dos genes envolvidos na síntese da glutatona, bem como na expressão de genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo em folhas de milho das variedades DKB 240 e SHS 3031. Este trabalho foi realizado no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CAL), no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

O Capítulo 3 apresenta o mapeamento dos genes relacionados a síntese de metabólitos semi-polares em frutos de pimenta. Esse estudo teve por objetivo combinar análises bioquímicas e genéticas de uma população segregante F2 para mapear genes e metabólitos da via de síntese dos flavonoides com o intuito de identificar QTLs e obter informações sobre a regulação molecular dessa via em frutos de pimenta. Este trabalho foi realizado no *Plant Research International (PRI)*, na *Wageningen University and Research centre (WUR)*, em Wageningen, Holanda, durante o doutorado sanduíche pelo projeto de cooperação internacional CAPES/Wageningen (projeto n. 005/09), sob supervisão do Dr. Arnaud Bovy.



## CAPÍTULO 1

### 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### *1.1 Antioxidantes*

As plantas respondem aos desafios ambientais alterando o metabolismo celular e acionando vários mecanismos de defesa. A sobrevivência a condições de estresse depende da capacidade da planta para perceber o estímulo, gerar e transmitir sinais, instigando mudanças bioquímicas que se ajustem ao metabolismo. Neste contexto, as plantas têm demonstrado uma variedade de mecanismos para combater, por exemplo, os radicais livres (ZHANG et al., 2006).

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um elétron não pareado e, portanto, extremamente reativos. Um elétron desemparelhado é aquele que ocupa sozinho um orbital atômico ou molecular. Estes radicais podem ser formados por vários mecanismos, tais como a adição de um único elétron a uma molécula não radical. Eles também podem ser formados quando a ligação covalente é quebrada, permanecendo um elétron do par de ligação em cada átomo (HALLIWELL, 2006). Causam estresse oxidativo em plantas as espécies ativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) (APEL; HIRT, 2004; FOYER; NOCTOR, 2005; ARASIMOWICZ; FLORISZAK-WIECZOREK, 2007; GILL; TUTEJA, 2010; FOYER; SHIGEOKA, 2011).

As espécies ativas podem reagir rapidamente desestabilizando outras moléculas e gerando outros radicais livres e, conseqüentemente, o estresse oxidativo. Para responder a esse estresse, as plantas possuem um complexo sistema de defesa antioxidante distribuído nas diferentes organelas celulares, como mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (SHARMA et al., 2012). Os compostos antioxidantes vão inibir o processo de oxidação, mesmo que estejam em concentração relativamente baixa, convertendo os radicais em espécies menos reativas (SHAO et al., 2008; GILL; TUTEJA, 2010). Assim sendo, um antioxidante é qualquer substância que retarda ou previne significativamente a oxidação do conteúdo celular, envolvendo proteínas, carboidratos e DNA, mantendo estes compostos no estado ativo para o metabolismo (FOYER; NOCTOR, 2005).

Considerando que o estresse oxidativo ocorre devido ao desbalanço entre a geração de espécies ativas e sua eliminação, a homeostase redox celular é governada pela presença de grandes grupos de antioxidantes que absorvem e tamponam redutores e oxidantes (FOYER; NOCTOR, 2005). O sistema de defesa antioxidante neutraliza os efeitos danosos das espécies ativas através de diferentes mecanismos, como atividade redutora e complexação potencial de metais pró-oxidantes. Estas atividades variam entre diferentes espécies e partes das plantas (TACHAKITTIRUNGROD et al., 2007).

O termo antioxidante foi inicialmente utilizado para identificar os compostos inibidores de radicais livres. Com o tempo, a aplicação dos termos 'sistema antioxidante' e 'antioxidante' foi ampliada e hoje inclui não somente o sistema de eliminação de espécies ativas e prevenção de sua formação, como também o sistema de detoxificação, que elimina compostos danificados que possam sofrer oxidação espontânea por oxigênio (PRADEDOVA; ISHEEVA; SALYAEV, 2011).

O sistema antioxidante desenvolvido pelas plantas inclui tanto atividades enzimáticas quanto não enzimáticas. A atividade coordenada desses antioxidantes regula a detoxificação e/ou eliminação das espécies ativas e, conseqüentemente, reduz o dano oxidativo nas plantas (CHOUDHURY et al., 2013).

O sistema não enzimático inclui ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol, carotenoides e flavonoides, entre outros compostos de baixa massa molecular; enquanto o sistema enzimático inclui superóxido dismutases (SODs), catalases (CATs), peroxidases (POXs), como ascorbato peroxidase (APX) e glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) e polifenol oxidases (PPOs). A função deste sistema antioxidante é sequestrar ou suprimir as espécies ativas de oxigênio (ROS) produzidas durante o estresse oxidativo e, assim, ajudar a planta a sobreviver a tais condições (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003; APEL; HIRT, 2004; GILL; TUTEJA, 2010; FOYER; SHIGEOKA, 2011).

Essa ampla variedade de antioxidantes difere na sua composição, propriedades físicas e químicas, mecanismos e sítios de ação. Considerando que um arranjo enzimático completo é necessário para regeneração da forma ativa dos antioxidantes, as enzimas, como SOD, CAT, por exemplo, transformam ROS e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) em compostos estáveis. A SOD, por exemplo, catalisa a dismutação de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) para peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) e é dividida em três classes de acordo com o

metal cofator. As FeSODs (utilizam o ferro como cofator) são encontradas no estroma dos cloroplastos e mantém similaridade estrutural com as MnSODs (utilizam manganês como cofator), as quais são encontradas principalmente em mitocôndrias. Já as Cu/ZnSODs (utilizam cobre e/ou zinco como cofator) podem estar localizadas tanto em cloroplastos, como também no citosol, apoplasto e peroxissomos e não possuem estrutura relacionada com as outras duas. Os genes da SOD já demonstraram ser sensíveis ao estresse, como consequência da formação de ROS (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003; DUTILLEUL et al., 2003; FERREIRA; DOMINGOS, 2012).

As enzimas que vão atuar na remoção do  $H_2O_2$  das células fotossintéticas incluem as CATs, que convertem  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ , e as APXs, que utilizam ascorbato como doador de elétron para redução de  $H_2O_2$ . APX faz parte do ciclo ascorbato-glutationa, que utiliza glutatona reduzida para regenerar o ascorbato, enquanto que a glutatona (GSH) é regenerada pela GR. Por sua vez, a GPX é uma enzima que catalisa a redução de  $H_2O_2$  e de hidroperoxilípídeo gerado durante a peroxidação lipídica. Essa reação vai formar água utilizando glutatona reduzida como substrato (APEL; HIRT, 2004; DIETZ, 2011; FOYER; SHIGEOKA, 2011). A superexpressão de isoformas das enzimas supressoras de radicais livres, como SOD, CAT, APX, GR, GST e GPX resultou em tolerância a estresse abiótico em várias espécies de plantas devido a eficiente capacidade de supressão dos radicais livres (GILL; TUTEJA, 2010).

Dentre os componentes responsáveis por atividades não enzimáticas do sistema antioxidante, estão os compostos de baixa massa molecular. Eles podem ser divididos em duas categorias: antioxidantes lipossolúveis e os hidrossolúveis. O tocoferol, quininas, bilirrubina e alguns polifenóis fazem parte dos antioxidantes lipossolúveis, enquanto o ácido ascórbico, GSH, ácido úrico e também outros polifenóis pertencem aos hidrossolúveis. Esses compostos agem como tampões redoxes interagindo com inúmeros componentes celulares. Eles também influenciam no crescimento e desenvolvimento das plantas através da modulação de processos desde mitose e alongação até senescência e morte celular. Por fim, é importante ressaltar que estes compostos podem influenciar a expressão gênica associada à resposta ao estresse biótico e abiótico, maximizando a defesa (FOYER; NOCTOR 2005).

A GSH é um bom sequestrador de radicais  $O^2$ , hidroxila (OH) e vários hidroperoxilípídeos e pode ainda ajudar na detoxificação de vários oxidantes como ozônio. A GSH também protege os grupamentos sulfidríla de enzimas do metabolismo celular e ainda tem um importante

papel na regeneração de aminoácidos (FERREIRA; DOMINGOS, 2012). Além disso, a GSH é considerada um marcador de estresse oxidativo por ser responsável pela homeostase redox celular e, assim, acionado pelo aumento intracelular da produção de  $H_2O_2$  (NOCTOR et al., 2012).

Os compostos fenólicos têm sido foco de muitas pesquisas recentes, em especial os flavonoides, que são amplamente distribuídos em plantas e têm mostrado exercer importante atividade antioxidante. Neste contexto, os flavonoides agem como sequestradores de ROS, alocando e neutralizando os radicais livres antes que eles possam danificar a célula, tornando-se, assim, importantes para as plantas sob condições ambientais adversas. Estes compostos fenólicos são metabólitos secundários que possuem uma estrutura química ideal para o sequestro dos radicais livres, porém sua capacidade de agir como antioxidante depende dos potenciais de redução dos radicais ligados a sua estrutura central e da acessibilidade desses radicais (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003; GILL; TUTEJA, 2010).

Assim, dentre os antioxidantes estão substâncias capazes de neutralizar os radicais livres, suprimir a oxidação desses radicais e ainda aquelas capazes de proteger estruturas biológicas (PRADEDOVA; ISHEEVA; SALYAEV, 2011). Considerando que estes inúmeros mecanismos estão envolvidos na resposta ao estresse oxidativo, qualquer incitação que perturbe o balanço redox celular, pode servir como um estímulo indutor a qualquer gene relacionado à defesa. Assim, não é necessário que apenas aqueles genes relacionados diretamente com o controle de espécies ativas, como ROS e RNS, sejam estimulados, mas também qualquer gene das vias de síntese dos compostos antioxidantes ou genes relacionados a essas vias (VRANOVA et al., 2002; FOYER; NOCTOR, 2005).

### *1.1.1 Flavonoides*

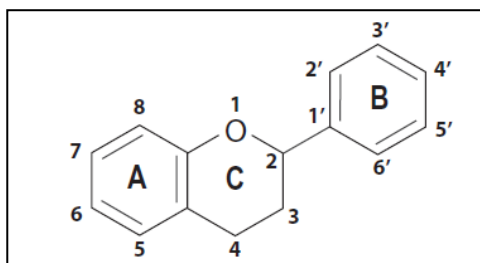
As plantas apresentam milhares de moléculas com estrutura fenólica conhecida (anéis aromáticos com grupamentos hidroxila), sendo que centenas delas são encontradas em frutas e vegetais. Estas moléculas são metabólitos secundários que podem ser classificados em diferentes grupos conforme o número de anéis fenólicos e os elementos estruturais que ligam estes anéis. Distinguem-se assim ácidos fenólicos,



flavonoides, estilbenos e lignanas (PALAFOX-CARLOS; AYALA-ZAVALA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2011).

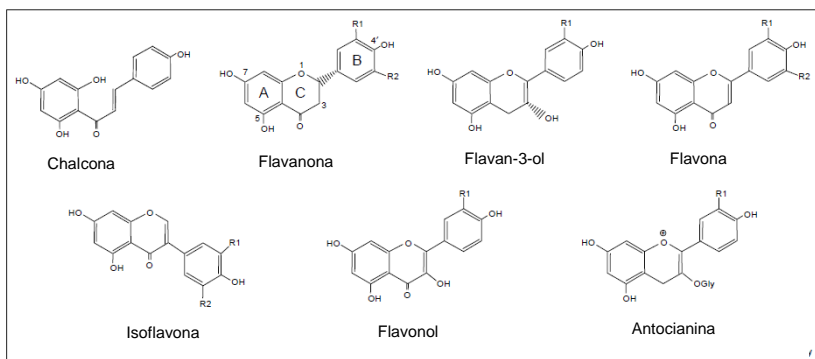
Os flavonoides são compostos que possuem uma mesma estrutura básica, consistindo em dois anéis aromáticos (anéis A e B) ligados por um anel heterocíclico com três átomos de carbono (anel C) formando um esqueleto de 15 carbonos (STRACKE et al., 2007). Baseando-se na posição e nas modificações nos anéis, mais de 10000 diferentes flavonoides já foram relatados e podem ser divididos em seis subclasses conforme a função do anel heterocíclico envolvido. Distinguem-se assim os flavonóis, as flavonas, as isoflavonas, as flavanonas, os flavanóis (catequinas e proantocianidinas, estas conhecidas como taninos) e as antocianinas (SCHIJLEN et al., 2004; TAYLOR; GROTEWOLD, 2005; AGATI et al., 2012).

**Figura 1.1** Estrutura geral e sistema de numeração de flavonoides.



Fonte: Lillo, Lea, Ruoff (2008).

As diferentes estruturas dessas subclasses podem ser vistas na Figura 1.2, onde também aparece a estrutura da chalcona, um dos primeiros compostos formado na via de síntese dos flavonoides. O tipo, quantidade e localização dos flavonoides nas plantas variam de acordo com a espécie vegetal, o estágio de desenvolvimento dos tecidos, podendo, ainda, ser modulado por sinais ambientais, como luz, temperatura e nutrição (LEPINIEC et al., 2006; PETRUSSA et al., 2013).

**Figura 1.2** Estrutura das principais classes de flavonoides.

Fonte: Taylor e Groteowold (2005) adaptado.

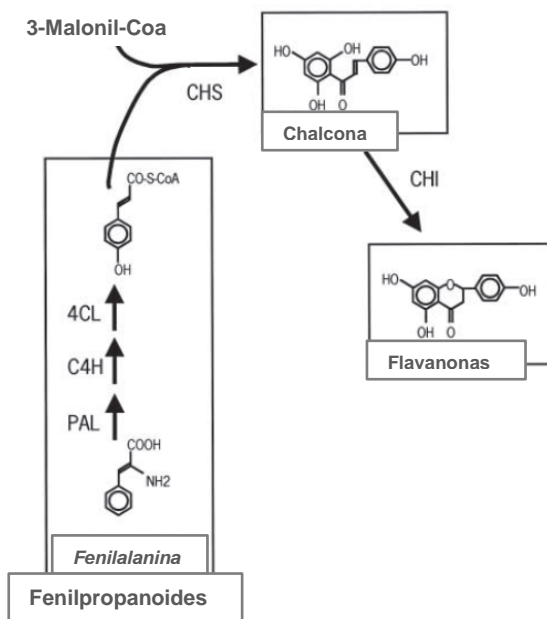
Representando uma grande família de compostos polifenólicos de baixo peso molecular, os flavonoides desempenham diversas e importantes funções. Embora a função mais visível seja a formação de pigmentos (sendo mais conhecidas as antocianinas, com coloração do vermelho ao roxo) que colorem flores, frutos e sementes para atrair polinizadores, os flavonoides incolores são os mais abundantes em plantas (STRACKE et al., 2007). É evidente que o papel dos flavonoides vai além das funções decorativas associadas com sua histórica classificação como metabólitos secundários. Abordagens genéticas combinadas com recursos genômicos em *Arabidopsis*, por exemplo, têm definido numerosas funções para os flavonoides (TAYLOR; GROTEWOLD, 2005).

Os flavonoides exercem um papel importante na biologia das plantas participando na sinalização hormonal; absorção de raios UV; resposta ao ataque de patógenos, a baixas temperaturas e à deficiência de nutrientes; fertilização e germinação do pólen; além de agir como molécula sinalizadora na interação planta-bactéria (SCHIJLEN et al., 2004; TAYLOR; GROTEWOLD, 2005; LEA et al., 2007). Além disso, em condições de estresse severo, pode haver inativação das enzimas antioxidantes e um aumento da síntese de flavonoides, tornando-os parte de um sistema antioxidante secundário (AGATI et al., 2012).

A biossíntese de flavonoides é uma das vias de metabólitos secundários mais estudadas. Os precursores da síntese da maioria dos flavonoides são malonil-CoA e *p*-cumaril-CoA, os quais são derivados, respectivamente, do metabolismo de carboidratos e da via de fenilpropanóides (WINKEL-SHIRLEY, 2001; SCHIJLEN et al., 2004),

como pode ser visto na Figura 1.3. Essa via foi bem caracterizada especialmente em *Arabidopsis*, *Zea mays* e também em *Vitis vinifera* (PETRUSSA et al., 2013).

**Figura 1.3** Início da biossíntese de flavonoides, influência da fenilalanina amônia liase (PAL). CHI, chalcona isomerase; CHS, chalcona sintase; C4H, cinamato 4-hidroxilase; 4CL, 4-cumaril CoA-ligase.



Fonte: Bovy et al. (2002) adaptado.

O início da biossíntese dos flavonoides (Figura 1.4) ocorre pela etapa enzimática catalisada pela chalcona sintase (CHS) resultando no composto chalcona. Na maioria das plantas, a chalcona não é o produto final, então, a via segue com muitas etapas enzimáticas para outras classes de flavonoides, como as flavanonas, dihidroflavonóis e, por fim, as antocianinas. Outras classes de flavonoides (isoflavonas, auronas, flavonas, proantocianidinas e flavonóis) representam ramos laterais da via e são derivados dos compostos intermediários (SCHIJLEN et al., 2004).

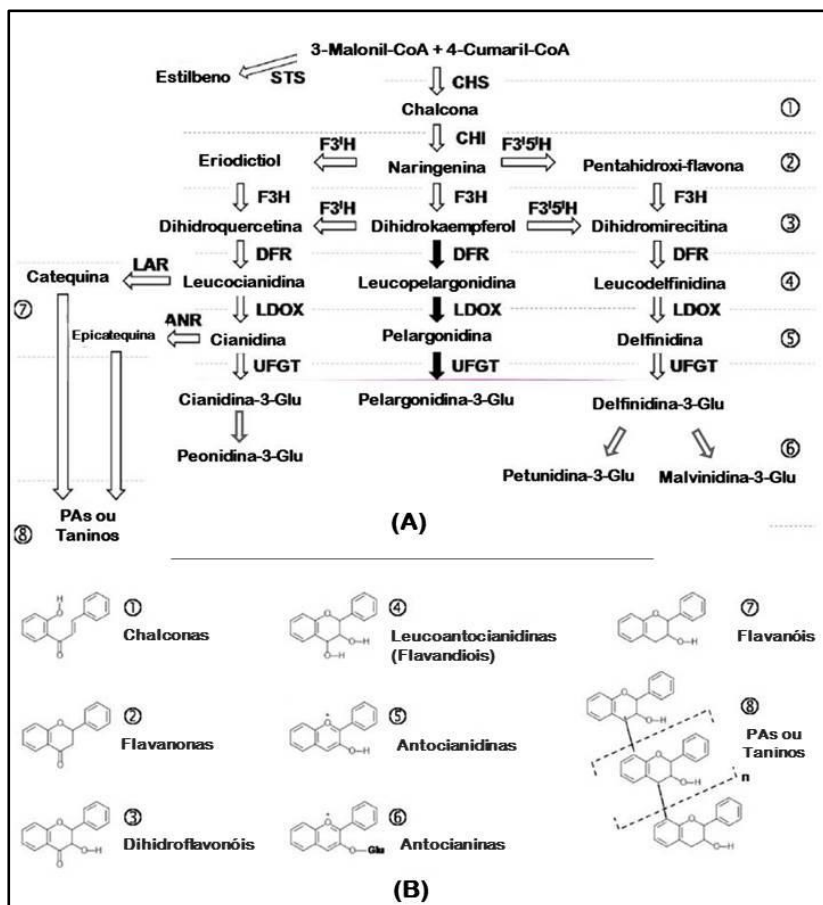
Considerando que a maioria das plantas não acumula chalconas, após a sua formação, a chalcona naringenina é rapidamente isomerizada

pela enzima chalcona isomerase (CHI) formando a flavanona naringenina. Mesmo na ausência de CHI pode ocorrer a isomerização espontaneamente, porém a taxa da reação não catalisada é  $10^6$  vezes menor (LILLO; LEA; RUOFF, 2008). A subsequente hidroxilação na posição C3 das flavanonas para dihidroflavonóis é realizada pela enzima flavanona-3-hidroxilase (F3H). A partir dos dihidroflavonóis, dihidroquercitina (DHQ) ou dihidromiricetina serão sintetizados os flavonóis pela ação da enzima flavonol sintase (FLS) (FERREYRA et al., 2010). Os dihidroflavonóis podem também sofrer redução a leucoantocianidinas (flavan-3,4-diol) realizada pela dihidroflavonol 4-redutase (DFR), utilizando NADPH como cofator. As leucoantocianidinas podem ser subsequentemente, oxidadas a cianidinas, pelargonidinas e delfinidinas, reação catalisada pela leucoantocianidina oxidase (LDOX). As pelargonidinas são os pigmentos responsáveis por coloração laranja, rosa ou vermelha; as cianidinas, os pigmentos vermelho ou magenta; e as delfinidinas, os pigmentos roxos ou azuis. Além da estrutura das antocianinas, diferenças no pH vacuolar, associação ou co-pigmentação com outros polifenóis e modificações aromáticas (glicosilação, complexação com metais) permitem uma gama quase infinita de variação na coloração de flores e frutos (SCHIJLEN et al., 2004; PETRUSSA et al., 2013).

A última etapa da via de síntese que vai produzir as antocianinas, envolve a glicosilação da cianidina, pelargonidina e delfinidina pela enzima UDP-glicose flavonoide 3-O-glicosídeo transferase (UFGT). Finalmente, a cianidina-3-glicosídeo e a delfinidina-3-glicosídeo podem ainda ser metiladas por metiltransferases (MTs) (PETRUSSA et al., 2013), como visto na figura 1.4.

A via de biossíntese de flavonoides pode ainda ser influenciada pelos níveis de fenilalanina amônia liase (PAL), pois é ela quem direciona o fluxo dos metabólitos secundários, como pode ser visto na Figura 1.3. Sendo a primeira enzima da via biossintética global dos fenilpropanóides, a PAL é conhecida por ser altamente controlada em nível transcricional em resposta a fatores abióticos, ao ataque de patógenos ou devido à demanda por lignina em tecidos especiais (LEA et al., 2007; MELLO et al., 2012). A existência de muitas isoenzimas e genes que codificam a PAL pressupõe que esses genes possam direcionar para vias específicas de metabólitos. A influência do gene *pal* no acúmulo de flavonoides foi confirmada, por exemplo, em *Arabidopsis thaliana* (LILLO; LEA; RUOFF, 2008).

**Figura 1.4** (A) Esquema da síntese dos flavonoides em plantas. CHS, chalcona sintase; CHI, chalcona isomerase; F3H, flavanona 3-hidroxilase; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilase; F3'5'H, flavonoide 3',5'-hidroxilase; DFR, dihidroflavonol redutase; LDOX, leucoantocianidina oxidase; UFGT, UDP-glicosil flavonoide 3-O-glicosil transferase; MT, metiltransferase; PAs, proantocianidinas; LAR, leucoantocianidina redutase; ANR, antocianidina redutase; STS, estilbeno sintase. Os números próximos aos grupos dos flavonoides estão relacionaods com as estruturas químicas mostradas em (B). (B) Estruturas químicas dos principais grupos de flavonoides.



Fonte: Petrusa et al. (2013) modificado.

Os flavonoides podem ser acumulados em compartimentos celulares diferentes daqueles onde foram sintetizados. Os locais de

armazenamento mais comuns são os vacúolos para antocianinas, flavonóis glicosilados e proantocianidinas, e a parede celular para os flobafenos e flavonóis metilados (TOSSI et al., 2011).

Muitos esforços têm sido direcionados para elucidar a via de biossíntese dos flavonoides através da caracterização dos genes envolvidos. Milho, boca-de-leão e petúnia foram os primeiros modelos experimentais estabelecidos para este sistema e trabalhos nessas espécies levaram ao isolamento de muitos genes estruturais e regulatórios dos flavonoides (WINKEL-SHIRLEY, 2001). Duas classes gênicas podem ser distinguidas na via de flavonoides: (I) genes estruturais codificadores de enzimas que participam diretamente na formação dos flavonoides e (II) genes regulatórios que controlam a expressão de genes estruturais (SCHIJLEN et al., 2004). Entretanto, em *A. thaliana*, que se tornou a planta modelo para o estudo da via de biossíntese dos flavonoides, surgiu uma terceira classe. Dos dezessete genes identificados em nível molecular, oito eram estruturais, seis codificavam proteínas regulatórias e três estavam envolvidos na compartimentalização dos flavonoides (ROUTABOUL et al., 2006).

Neste contexto, o ramo da via de fenilpropanoides que produz compostos flavonoides em plantas torna-se um excelente modelo para estudo de regulação transcricional. Isso se deve ao fato de que os genes de síntese de flavonoides são regulados durante o desenvolvimento e em resposta a vários estresses bióticos e abióticos por uma combinação de fatores de transcrição (GONZÁLES et al., 2008).

As propriedades antioxidantes dos flavonóides representam uma característica bioquímica robusta das plantas expostas a diferentes estresses oxidativo. É interessante notar que estas funções podem ser realizadas mesmo em baixas concentrações de flavonoides. Dessa maneira, especula-se que os flavonoides exerçam um papel chave no controle celular da homeostase de ROS juntamente com peroxidases e ascorbato, reduzindo  $H_2O_2$  vacuolar (AGATI et al., 2012).

Como consequência da potente propriedade antioxidante, os flavonoides foram reconhecidos como importantes componentes nutracêuticos da nossa dieta (BOVY et al., 2002; TAYLOR; GROTEWOLD, 2005). Deste modo, além das propriedades antioxidantes no organismo humano, os flavonoides têm atividades antiproliferativa, antitumor e pró-apoptótica. Provavelmente isso seja consequência de seus efeitos sobre enzimas, como a atividade estrogênica e a inibição da atividade da proteína tirosina quinase (TAYLOR; GROTEWOLD, 2005) e de sua interação com vias de transdução de sinal, que levam a alterações na expressão de genes

envolvidos na sobrevivência e na proliferação celular, contribuindo para promoção de saúde. Por esta razão, há um crescente interesse no desenvolvimento de cultivos alimentares agronomicamente importantes com composição otimizada, envolvendo maiores níveis de flavonoides (SCHIJLEN et al., 2004). Pelo menos parte das propriedades promotoras de saúde dos flavonoides pode ser atribuída a essa atividade antioxidante, uma vez que a estrutura química da maioria dos polifenóis parece ser ideal para o sequestro de radicais livres (SCHIJLEN et al., 2004; TAYLOR; GROTEWOLD, 2005).

Um fruto que representa uma rica fonte de flavonoides, além de outros metabólitos com propriedades potenciais de promoção de saúde, é o fruto da pimenta (*Capsicum*). Diferentes variedades de pimenta, considerando que existem 25 espécies, vão apresentar frutos com variação na composição e nos níveis destes antioxidantes influenciados pelo genótipo, fatores de desenvolvimento e ambientais. Embora as vias de síntese de flavonoides estejam bem entendidas em algumas espécies de plantas, como *Arabidopsis* e tomate, o conhecimento detalhado da regulação gênica e de desenvolvimento dessa via em pimenta ainda é limitado (WAHYUNI et al., 2011).

A modulação do acúmulo de flavonoides é um dos sistemas regulatórios mais bem conhecido em plantas. Os fatores de transcrição já descritos em *Arabidopsis*, milho, petúnia e uva pertencem a duas classes de proteínas regulatórias: proteínas bHLH e proteínas MYB. Apesar de os fatores MYB estarem envolvidos no controle da síntese de todas as classes de flavonoides, há evidências de que os genes relacionados a essa síntese são regulados pela ação coordenada de um membro de cada classe dos fatores de transcrição (FERREYRA et al., 2010; PETRUSSA et al., 2013). Foram identificados alguns reguladores, em particular os genes que codificam os fatores de transcrição R2R3-MYB, PAP1 e PAP2, e os fatores bHLH GL3 e EGL3 (BOREVITZ et al., 2000; ZHANG et al., 2003; COMINELLI et al., 2008). Por exemplo, *A. thaliana* superexpressando *pap1* ou *pap2* apresentou intensa pigmentação púrpura em diversos órgãos vegetativos durante o desenvolvimento. Nas plantas superexpressando *pap1*, alguns genes de síntese de flavonoides são expressos constitutivamente e há incremento no acúmulo de antocianinas (BOREVITZ et al., 2000; TOHGE et al., 2005). Genes requeridos para a síntese de 3-deoxiflavonoides e flobafenos têm sido identificados em milho, como *chs2* (que codifica a CHS), *chi* (codifica a CHI) e *al* (codifica a dihidroflavonol redutase), sendo que eles estão sob controle do *pericarp color (p1)*. Esses genes da via de biossíntese dos flavonoides são responsáveis pelo aumento da

pigmentação vermelha em tecidos de milho (CHOPRA; ATHMA; PETERSON, 1996; LECLERE; SCHMELZ; CHOUREY, 2007). Além disso, acredita-se que mudanças na homeostase redox celular ative a síntese de flavonoides, uma vez que os fatores de transcrição da família MYB são regulados por alteração no potencial redox celular (AGATI et al., 2012).

Mesmo que muito tenha sido elucidado, uma abordagem sistemática levando em consideração tanto os níveis de expressão gênica quanto as características metabólicas, incluindo as propriedades enzimáticas, é necessária para um entendimento completo da via de biossíntese dos flavonoides e de sua regulação em muitos alimentos, como o milho e a pimenta.

### *1.1.2 Glutathione*

Como visto anteriormente, as plantas necessitam de uma eficiente proteção antioxidante para evitar possíveis danos causados por ROS e/ou RNS. Entre os muitos compostos de baixa massa molecular relacionados a essa função pode ser destacada a glutathione (GSH), um tripeptídeo tiol formado por glutamato, cisteína e glicina ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly). Este composto é o principal responsável pela homeostase redox da maioria das células aeróbicas e o mais abundante tiol de baixa massa molecular presente em plantas (INNOCENTI et al., 2007), sendo considerado o metabólito mais importante na defesa celular contra dano oxidativo induzido por ROS (GILL; TUTEJA, 2010). Assim, a GSH deve ser vista como molécula central no metabolismo celular e sinalização redox (NOCTOR et al., 2012).

O tripeptídeo glutathione ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycine) é um composto abundante nos tecidos de plantas, podendo ser encontrado em vários compartimentos celulares como o citosol, o retículo endoplasmático, o vacúolo e a mitocôndria. A GSH é a principal forma de armazenamento de enxofre e atua como um potente detoxificante de xenobióticos através de um complexo GSH-conjugado e pode servir como um precursor de fitoquelatinas. Juntamente com sua forma oxidada (GSSG), a glutathione mantém o balanço redox nos compartimentos celulares (NOCTOR et al., 1998). O papel da GSH na defesa antioxidante deve-se também a sua capacidade de regenerar outro forte antioxidante solúvel em água, o ácido ascórbico, através do ciclo ascorbato-glutathione (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT,

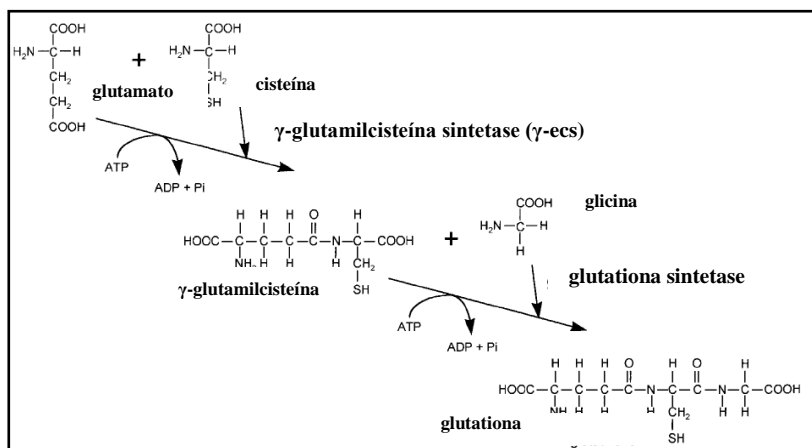


2003). Além disso, a GSH ainda regula a expressão de genes de defesa ao estresse (MULLINEAUX; RAUSCH, 2005; GILL; TUTEJA, 2010).

A biossíntese de GSH ocorre a partir dos aminoácidos constituintes em duas etapas dependentes de ATP (Figura 1.5). A primeira etapa é catalisada pela  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase ( $\gamma$ -ECS; EC 6.3.2.2.), onde a  $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ -EC) é produzida a partir do ácido L-glutâmico e da L-cisteína. Em uma segunda etapa, a glutiona sintetase (GSH-S; EC 6.3.2.3.) catalisa a formação de GSH pela adição da glicina na extremidade carboxiterminal da  $\gamma$ -EC (NOCTOR et al., 1998).

Genes que codificam estas enzimas já foram identificados em várias plantas como *Arabidopsis*, *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Brassica juncea* e *Medicago trunculata*, sendo que cada enzima é codificada por um único gene. Em *Arabidopsis*,  $\gamma$ -ECS parece ser codificada por um único gene,  *$\gamma$ -ecs* (antes denominado *gsh1*), enquanto que os genes que codificam GSH-S produzem isoformas citosólica e plastídica por *splicing* alternativo de mRNA. Dois fatores principais provavelmente atuam no controle do acúmulo de GSH, os quais são a abundância de  $\gamma$ -ECS e a disponibilidade de cisteína (NOCTOR et al., 2002; GÓMEZ et al., 2004; NOCTOR et al., 2012).

**Figura 1.5** Representação esquemática da rota da biossíntese da glutatona. ADP, adenosina difosfato; ATP, adenosina trifosfato; Pi, fosfato ionizado.



Fonte: Noctor et al. (1998), adaptado.

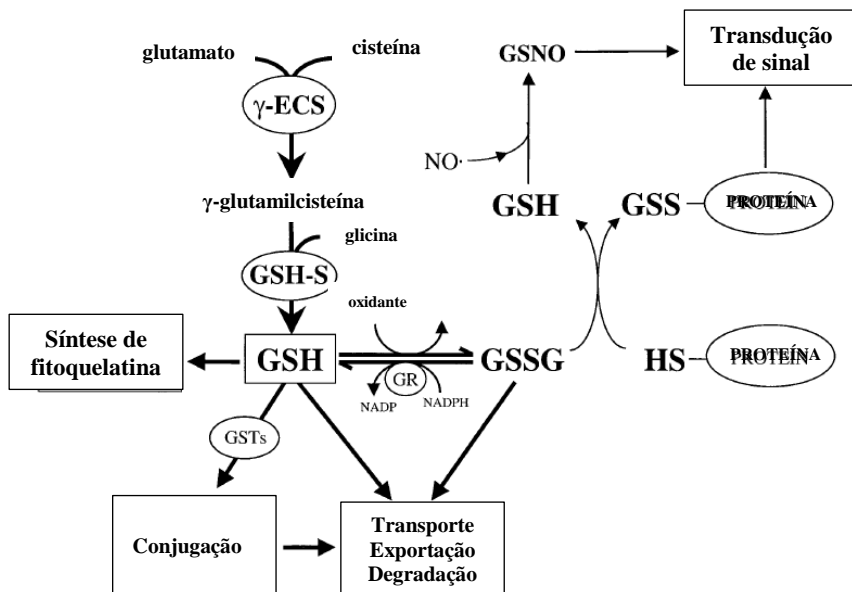
A via de biossíntese de GSH é estimulada por NO em células animais e leveduras, o que é atribuído a maior expressão de enzima  $\gamma$ -

ECS. Innocenti e colaboradores (2007) mostraram que em *Medicago trunculata* o NO pode regular a síntese de GSH pelo estímulo da expressão gênica de  $\gamma$ -*ecs* e *gsh-s*, os dois principais genes envolvidos em sua síntese.

Em relação ao NO, a GSH pode também reagir com esta molécula formando nitrosoglutationa (GSNO), que age nas reações de transnitrosilação, passando seu grupamento NO para cisteínas de tióis dentro da proteína alvo. Portanto, a GSNO funciona como fonte de NO para S-nitrosilação de proteínas. Esta molécula estável pode ainda trabalhar na estocagem e transferência de NO, por exemplo, para remoção deste gás da célula pode ocorrer formação de GSNO com subsequente redução à GSSG e nitrato (ARASIMOWICZ-FLORYSZAK-WIECZOREK, 2006; SPADARO et al., 2010; BAUDOUIN, 2011).

A GSH é um metabólito multifuncional exercendo também um importante papel no desenvolvimento e crescimento das plantas, está envolvida na modulação da atividade enzimática, no controle do desenvolvimento de raiz e no processo de modificação de hormônios e outros compostos endógenos (GÓMEZ et al., 2004; ZHANG; SUN, 2009). Além disso, está envolvida na estocagem e transporte de enxofre reduzido, na proteção contra metais pesados como precursores na síntese de fitoquelatinas, no sequestro de ROS pelo ciclo ascorbato-glutationa (INNOCENTI et al., 2007), no processo de morte celular programada, na transição G1-S do ciclo celular e no acúmulo de antocianinas (ZHANG; SUN, 2009). De forma importante, a GSH ainda protege as proteínas da desnaturação causada pela oxidação de grupos tióis durante o estresse. Essa função envolvendo oxidação de grupo tiol forma a glutatona dissulfeto, ou GSSG (Figura 1.6) (NOCTOR et al., 2002).

**Figura 1.6** Biossíntese de glutatona e processos de interação em células vegetais. GR, glutatona redutase; GSH, glutatona reduzida; GSH-S, glutatona sintetase; GSNO, nitroso glutatona; GSSG, glutatona oxidada; GSTs, glutatona transferases.



Fonte: Noctor et al. (2002), adaptado.

Durante o metabolismo, o ciclo de glutatona varia do tripeptídeo reduzido (GSH) para a forma dissulfeto oxidada (GSSG). Enquanto oxidantes favorecem a formação de GSSG, a manutenção dos níveis de GSH é feita pela redução de GSSG pelo NADPH, reação catalisada pela GR (Figura 6) (NOCTOR; FOYER, 1998).

A dupla GSH/GSSG é adequada para o papel de sensor redox, indicando o balanço redox celular tiol-dissulfeto e produzindo efeitos no metabolismo e expressão gênica. Mudanças no status da glutatona podem causar importantes consequências através da modificação de funções metabólicas associadas com os genes regulados pela glutatona. Um exemplo são os elementos identificados em região próxima ao promotor da chalcona sintase (CHS), os quais foram induzidos por alteração no status da glutatona (NOCTOR et al., 2002).

A GSH está também relacionada às reações de defesa contra estresse biótico, o que pode ser comprovado por mudanças acentuadas

na sua concentração durante resposta de hipersensibilidade ao ataque de patógenos. Embora o aumento da concentração de glutatona induzida por patógeno e a indução de *PAL* e *CHS* dependente de GSH terem sido demonstradas (VANACKER; CARVER; FOYER, 2000), é improvável que a GSH seja o sinal primário responsável pelo aumento das fitoalexinas após ataque de patógenos. Isto deve-se ao fato de as mudanças na glutatona intracelular serem muito lentas para iniciar a indução (NOCTOR et al., 2002) e também por já ter sido demonstrada a influência de NO na biossíntese de fitoalexinas (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007). Além disso, já foi demonstrado que indução de glutatona precede a indução de transcritos para metabolismo dos fenilpropanoides (VANACKER; CARVER; FOYER, 2000).

A GSH é ainda um substrato para a enzima glutatona S-transferase (GST). Essa proteína faz parte de uma família grande e heterogênea que compartilha a característica de catalisar o ataque a átomos de enxofre da GSH. Neste contexto, a reação clássica catalisada pela GST é a formação de uma ligação covalente entre o átomo de enxofre da glutatona e um composto eletrofílico (NOCTOR et al., 2012). Sendo assim, as GSTs são responsáveis pela remoção de compostos potencialmente genotóxicos ou citotóxicos devido a sua capacidade de reação com sítios eletrofílicos em DNA, RNA e proteínas. Entretanto, as funções das GSTs não se limitam a essas reações, elas também estão envolvidas em uma importante função 'ligante', por exemplo, na via de biossíntese das antocianinas. As proteínas, neste caso, seriam necessárias para exportar eficientemente estes compostos do citosol (NOCTOR et al., 2002). Foi observado, por exemplo, o conteúdo de antocianinas em folhas de *Arabidopsis* está correlacionado com o conteúdo de GSH em plantas com capacidade modificada de síntese de GSH (XIANG et al., 2001).

## 1.2 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula lipofílica bioativa pequena, ubíqua e postulada como um composto que age contra o estresse em amplo espectro. Este gás altamente difusível e que rapidamente transpõe a membrana celular (STEFANO; FERRARINI; DELLEDONNE, 2005; CRAWFORD, 2006) possui uma meia vida

curta (aproximadamente 3 segundos) na presença de O<sub>2</sub> devido a sua alta reatividade. Por isso, a grande maioria das pesquisas com NO em organismos vivos envolve aplicação de doadores de NO (TOSSI; LAMATTINA; CASSIA, 2009).

Este mensageiro secundário foi descrito primeiramente como um composto tóxico, mas atualmente o NO é reconhecido como um importante sinalizador na fisiologia celular de animais e plantas (GARCÍA-MATA; LAMATTINA, 2002; PAGNUSSAT et al., 2002). As funções fisiológicas do NO têm sido extensivamente documentadas em mamíferos, sendo que ele foi estabelecido como uma importante molécula sinalizadora em sistemas imune, vascular e nervoso. Já em plantas, evidências sugerem que o NO esteja envolvido no crescimento, desenvolvimento e em resposta a sinais ambientais que afetam a fotomorfogênese, a expansão foliar, o crescimento de raiz, o crescimento do tubo polínico e a senescência (EDERLI et al., 2009). Além disso, o NO também exerce atividade antioxidante em vias similares a dos flavonoides (TOSSI et al., 2011).

Interagindo com ROS e outras pequenas moléculas, o NO é parte fundamental de muitas vias de transdução de sinal e participa na regulação de múltiplas respostas a uma variedade de estresses bióticos e abióticos, tais como seca, calor e infecção por patógenos (LOMBARDI et al., 2010). É importante salientar que a interação ROS/NO pode ser citotóxica ou citoprotectiva dependendo da concentração relativa de ROS/NO (INNOCENTI et al., 2007).

O NO pode regular a atividade enzimática por S-nitrosilação e modular a expressão gênica através da interação com a GSH (LOMBARDI et al., 2010). Além disso, o NO também atua como peça-chave regulando a via de biossíntese dos fenilpropanóides, o que já foi demonstrado em duas espécies: *Zea mays* (monocotiledônea) e *A. thaliana* (dicotiledônea). Resultados recentes indicam que o NO alivia o estresse oxidativo gerado por raios UV-B em folhas de milho por duas rotas principais: 1) sequestro de espécies ativas de oxigênio e 2) aumento de flavonoides, que contribuem para a redução de espécies ativas de oxigênio (TOSSI et al., 2011).

Em muitas plantas, O NO tem influenciado de forma importante o crescimento, desenvolvimento e defesa celular (STEFANO; FERRARINI; DELLEDONNE, 2005; PINTO et al., 2006; ZAGO et al., 2006). Muitas evidências sugerem, por exemplo, a ativação da morte celular programada durante a reação de hipersensibilidade em defesa a patógenos, a qual é codificada pelo genoma e ativada pela fina modulação dos níveis de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO. Assim, tanto NO quanto ROS

são necessários para desencadear a morte celular (PINTO et al., 2006). Ambos são também componentes de um sistema de defesa altamente integrado que envolve a ativação do fluxo de íons, mudança no padrão de fosforilação de proteínas, no pH extracelular, no potencial de membrana, na oxidação de proteínas da parede celular e alterações nos níveis de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que desencadeiam a expressão local de genes de resistência (STEFANO; FERRARINI; DELLEDONNE, 2005). Isso indica que NO e ROS exercem um papel chave na regulação da resposta das plantas a sinais e estímulos endógenos, como os hormônios auxina e ácido abscísico (ZAGO et al., 2006). Neste contexto, o NO age como molécula sinalizadora, uma vez que ele pode ativar uma sequência de eventos acionando respostas de defesa celular (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007).

Em relação a atividade antioxidante, o NO pode reagir diretamente com ROS, como mencionado anteriormente, e também com metais de transição. Além disso, pode gerar RNS, que compreendem o NO e outras moléculas como peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), S-nitrotióis (RSNOs) e a GSNO. Estas RNS são moléculas tóxicas em altas concentrações, mas também funcionam como sinalizadores em resposta a estresse biótico e abiótico, podendo regular muitas funções biológicas pela reação com moléculas celulares, incluindo proteínas, vitamina E, e ácidos nucleicos (TOSSI et al., 2011).

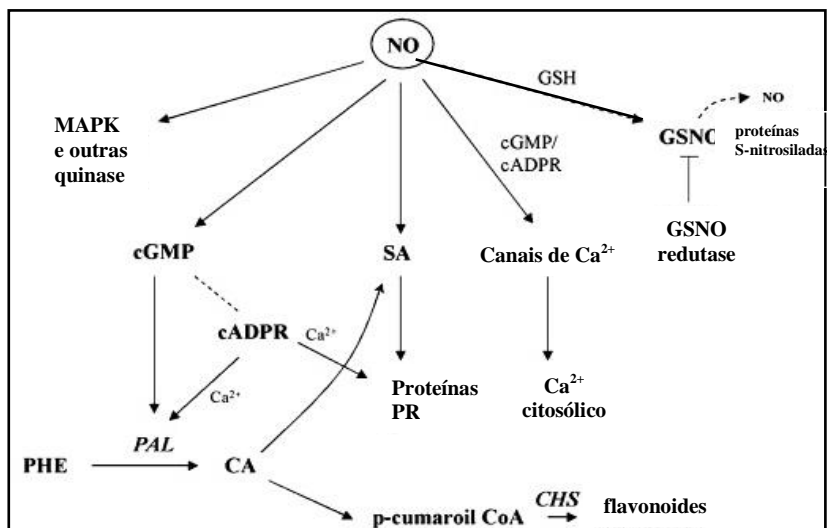
O NO como antioxidante pode também atuar independente do ROS na indução de vários genes de defesa incluindo proteínas relacionadas à patogênese, como PR-1, e enzimas do metabolismo de fenilpropanóides, como a PAL, envolvidas na produção de lignina e do mensageiro secundário ácido salicílico (STEFANO et al., 2006; ZAGO et al., 2006). Além desses, foi observado que o NO pode também regular a expressão gênica de *CHS*, *GPX* e *GST* em soja, tabaco e *Arabidopsis* em experimentos utilizando um doador de NO (GRÜN et al., 2006; ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007).

Além disso, o NO interage com elementos sinalizadores como cADPR (adenosina difosfato-ribose cíclica), cGMP (Guanosina 3', 5'-cíclica monofosfato), canais iônicos,  $\text{Ca}^{2+}$ , entre outros (Figura 1.7). Além disso, muitas evidências estão aparecendo sobre a interação do NO com alguns hormônios, como jasmonato, etileno e ácido salicílico, durante resposta adaptativa a condições adversas (GARCÍA-MATA; LAMATTINA, 2002). Outros genes induzidos, independentemente, tanto por NO quanto por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , estão relacionados à defesa e incluem aqueles que codificam a oxidase alternativa (AOX), a GST e enzimas chaves da via de biossíntese do ácido jasmônico (JA), por exemplo. Por

outro lado, a produção de antioxidantes, como flavonoides e peroxidases, é regulada apenas por NO (ZAGO et al., 2006). Deste modo, fica claro que o NO é um importante componente do sistema de defesa das plantas (STEFANO; FERRARINI; DELLEDONNE, 2005).

Dessa maneira, o NO não é apenas uma molécula de sinalização de estresse, mas também pode agir como um sinal intrínseco no crescimento e desenvolvimento da planta (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007).

**Figura 1.7** Representação das funções de sinalização do NO. Linhas pontilhadas representam funções potenciais. CHS, chalcona sintase; CA, ácido cinâmico;  $\text{Ca}^{2+}$ , influxo de cálcio; cADPR, adenosina difosfato-ribose cíclica; cGMP, guanosina 3', 5'-monofosfato cíclica; MAPK, proteína quinase ativadora de mitogênese; PAL, fenilalanina amônia liase; PHE, fenilalanina; PR, proteínas relacionadas a patogênese; SA, ácido salicílico; GSH, glutationa GSNO, nitrosoglutationa.



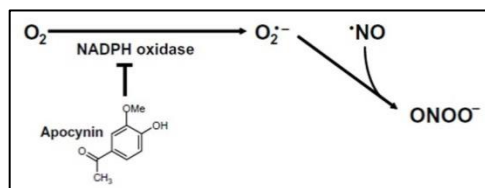
Fonte: Stefano et al. (2006), modificado.

Estudos envolvendo mutantes com produção alterada de NO já foram desenvolvidos (MODOLO et al., 2006; SELIGMAN et al., 2008; FRUNGILLO et al., 2013), entretanto ainda há pouca informação, e a compreensão do papel do NO em plantas é ainda limitada. Dessa maneira, experimentos para elucidar a sinalização de NO são ainda

realizados utilizando doadores e sequestradores de NO, o que torna difícil a comparação dos resultados obtidos em diferentes experimentos devido à variação na quantidade de NO liberado por diversos doadores sob diferentes condições (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2006; EDERLI et al., 2009). Além disso, apesar de o tratamento de tecidos vegetais com doadores de NO utilizar uma metodologia simples, eles apresentam alguns problemas técnicos devido ao processo de decomposição do doador dependente de fatores externos. Por exemplo, o doador mais utilizado, o nitroprussiato de sódio (SNP), é extremamente fotossensível e sua degradação é também promovida por oxigênio e temperatura (TOSSI; LAMATTINA; CASSIA, 2009).

O nível de NO estável é aumentado em células endoteliais humanas por apocinina (RIGANTI et al., 2007; STEFFEN; SCHEWE; SIES, 2007), um composto originalmente extraído de raízes de *Picorrhiza kurroa*, a qual é uma pequena erva perene que cresce no Himalaia. Extratos de *P. kurroa* são utilizados na medicina tradicional para o tratamento de doenças associadas com inflamação crônica. A apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona, acetovanilona CAS 498-02-2), quando metabolizada, reduz o estresse oxidativo em fagócitos, inibindo a formação de superóxido pela NADPH oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase - NOX) e limitando a formação de peroxinitrito, deixando o NO livre (Figura 1.8) (TOSSI; LAMATTINA; CASSIA, 2009; TOSSI; CASSIA; LAMATTINA, 2009; STEFFEN; SCHEWE; SIES, 2007). Há evidências de que, em células humanas, a apocinina sofre dimerização e o mecanismo de ação da apocinina dimerizada seja através da competição pelo sítio de ativação da NADPH oxidase (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008).

**Figura 1.8** Representação da inibição da NADPH oxidase pela apocinina, inibindo a formação de superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) e, conseqüentemente, de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), deixando óxido nítrico (NO) livre.



Fonte: Steffen; Schewe; Sies (2007), modificado.



Já foi demonstrado que a apocinina induz o acúmulo dose-dependente de NO em folhas de plântulas de milho (TOSSI; LAMATTINA; CASSIA, 2009; MELLO et al., 2012). O NO produzido apresenta ação bioativa e antioxidante, uma vez que conferiu uma maior tolerância ao estresse oxidativo induzido por raios UV-B. Além de induzir o acúmulo de NO em plântulas de milho, a presença de apocinina conferiu tolerância ao estresse oxidativo produzido por radiação UV-B ou por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Deste modo, a apocinina pode ser utilizada como uma alternativa para o estudo da funcionalidade do NO em plantas, uma vez que induz sua produção (TOSSI; LAMATTINA; CASSIA 2009). Em contrapartida, o 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (cPTIO) é um composto capaz de sequestrar o NO, sendo rotineiramente utilizado para remover o NO de tecidos biológicos (BETHKE; LIBOUREL; JONES, 2006; ZHANG et al., 2007; EDERLI et al., 2009; TOSSI et al., 2011), assim, podendo ser utilizado como um controle nos estudos de NO em plantas.

Em um estudo anterior do nosso grupo foi observado por microscopia que a apocinina induziu a liberação de NO endógeno em folhas de milho SHS 3031 após 12h de tratamento. Entretanto, apesar de a expressão de genes envolvido na síntese de glutathione, (*γ-ecs* e *gsh-s*) ter sido modulada pela presença de SNP, neste mesmo estudo a apocinina não alterou a expressão desses genes. (MELLO et al., 2012). Considerando que os genes de resposta ao NO são, em sua maior parte, relacionados ao estresse, exercendo funções desde a defesa até a interação com o metabolismo hormonal e o desenvolvimento da planta (MOREAU et al., 2010), estudos que verifiquem a possível modulação desses genes tornam-se relevantes.

### ***1.3 Análise de expressão gênica***

A análise de expressão gênica, realizada através da quantificação dos níveis de transcritos, vem sendo o principal foco de estudos dentro da biologia molecular. Avaliando a quantidade de RNA celular, torna-se possível determinar o quanto um gene específico está sendo expresso em um organismo em um determinado momento. Para muitos genes, os níveis de expressão podem variar bruscamente de gene para gene, de célula para célula ou em diferentes condições experimentais (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

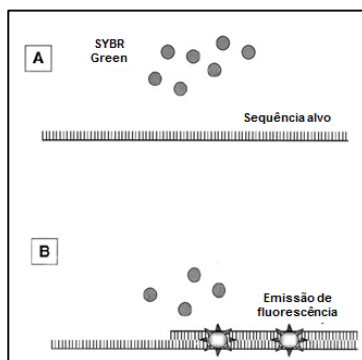
A transcrição reversa combinada com a reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) provou ser uma forte ferramenta para quantificar a expressão gênica (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A introdução de um procedimento baseado na cinética de fluorescência permitiu a quantificação dos produtos de PCR em "tempo real". Assim, a RT-PCR, pode também ser chamada de PCR em tempo real, sendo uma técnica mais sensível e acurada do que outros métodos de quantificação. Essa técnica é muito mais rápida, pois foi desenvolvida para fornecer informações tão rapidamente quanto o próprio processo de amplificação, não necessitando manipulações pós-PCR (GIULIETTI et al., 2001).

A PCR em tempo real ou qPCR permite o monitoramento da reação de amplificação em tempo real (ciclo a ciclo), em um sistema fechado, sem interferências externas no progresso da reação. Para isso um sinal fluorescente é detectado em proporção ao aumento da quantidade do produto de amplificação. Esta fluorescência é emitida por compostos que podem estar ligados a sondas, ou compostos que podem ligar-se ou intercalar-se diretamente na dupla fita do DNA amplificado. As sondas (como Taqman®, FRET, Scorpion™) são sequências específicas de DNA que se ligam à região central da sequência-alvo, aumentando a especificidade do método (WISEMAN, 2002; LIPP et al., 2005).

Entre os compostos intercalantes, o mais utilizado é o SYBR Green, o qual se liga inespecificamente à dupla fita de DNA, mas não se liga à fita simples, uma vez que se intercala no sulco menor da dupla fita. Quando este fluoróforo está livre na solução de reação ele não é capaz de emitir fluorescência, a qual será liberada no momento que as moléculas de SYBR Green intercalarem-se nos produtos amplificados. Assim, o aumento da quantidade do DNA sintetizado resulta em um aumento do sinal fluorescente (esquema representativo na Figura 1.9). A maior vantagem da utilização desse composto fluorescente é exatamente a não especificidade, uma vez que ele pode ser utilizado com qualquer par de iniciadores para a amplificação de qualquer sequência alvo. Entretanto, esta se torna também a maior limitação desse sistema de quantificação, devido ao risco de detecção de produtos de PCR não específicos, já que o SYBR Green pode ligar-se a qualquer sequência de dupla fita, incluindo dímeros de iniciadores. Contudo, essas amplificações não específicas podem ser diferenciadas pela análise das curvas de dissociação térmica (*melting*), onde diferentes fragmentos geralmente apresentam diferentes temperaturas de dissociação ( $T_M$ ) e diferentes intensidades (representado na Figura 1.10) (GIULIETTI et al., 2001; WEIGHARDT et al., 2004).

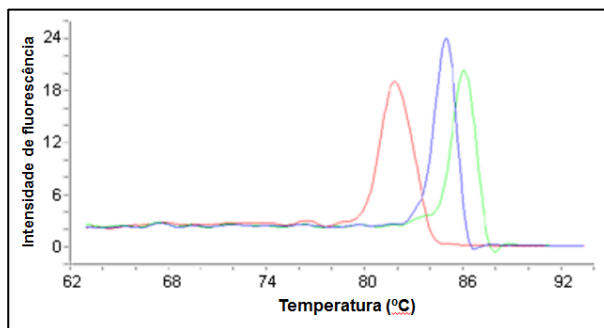
A primeira etapa para a realização de quantificação de transcritos por qPCR é a síntese de DNA complementar (cDNA), a qual é catalisada pela enzima transcriptase reversa, utilizando como molde o RNA total extraído de uma amostra. A partir do cDNA sintetizado é realizada a quantificação de transcritos de genes alvos e/ou genes de referência por qPCR (LIPP et al., 2005; CIKOS; BUKOVSKÁ; KOPPEL, 2007; RUIJTER et al., 2009).

**Figura 1.9** Representação da amplificação por PCR em tempo real utilizando SYBR Green. (A) SYBR Green livre na solução não emite fluorescência. (B) SYBR Green ligado à dupla fita de DNA, emite fluorescência.



Fonte: Giulietti et al. (2001), adaptado.

**Figura 1.10** Gráfico representando curvas de dissociação térmica (*melting*) de três diferentes produtos de amplificação (linhas de diferentes cores).

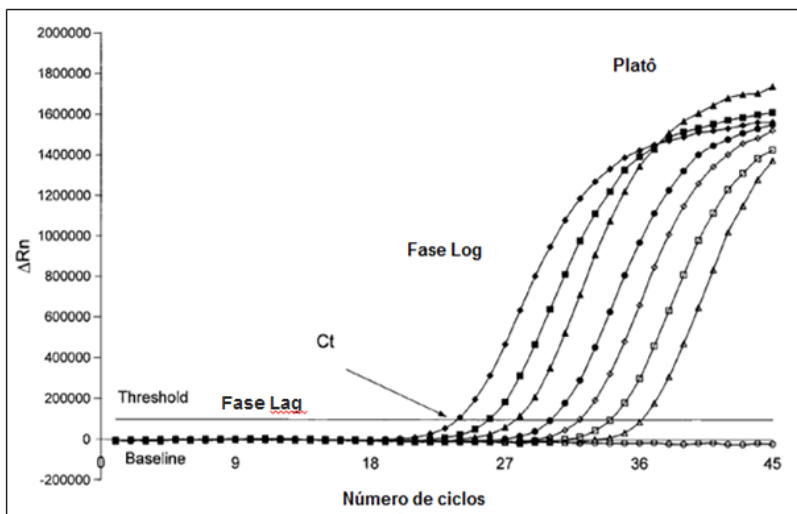


Fonte: Simpson et al. (2000), modificado

Durante o curso da qPCR ocorrem três fases distintas: a primeira fase é a fase “lag”, onde aparece o sinal do ruído de fundo (*background*); a segunda, é a fase exponencial, onde é detectado o sinal fluorescente, uma vez que a quantidade de produtos de amplificação dobra a cada ciclo; a terceira, é a fase final, onde há formação de um platô, sem aumento do número de produtos de amplificação (Figura 1.11) (DINON, 2011).

Considerando que um aumento na emissão de fluorescência é detectado na fase exponencial da qPCR, é calculado o  $\Delta Rn$ , cuja equação é  $\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$ , onde  $Rn^+$  é a emissão de fluorescência do produto a cada ponto (tempo); e  $Rn^-$  é a emissão de fluorescência no ponto inicial (*baseline*). Com esses dados, são construídos gráficos de amplificação a cada ciclo, como pode ser visto um exemplo na Figura 1.11 (GIULIETTI et al., 2001).

**Figura 1.11** Gráfico da amplificação de produtos de PCR em tempo real ( $\Delta Rn$  versus número de ciclos) apresentando as diferentes fases da reação (Lag, exponencial ou Log e platô), bem como o ponto de determinação do  $C_T$ .



Fonte: Giulietti et al. (2001), modificado.

O ponto de quantificação inicial dos produtos amplificados é o ciclo *threshold* ( $C_T$ ). Este é definido como o ponto no qual o sinal fluorescente cruza arbitrariamente a linha *threshold*. O limiar de detecção

ou linha *threshold* é definido como o nível de sinal fluorescente normalizado, o qual deve estar ajustado acima da linha de base, mas deve ser suficientemente baixo para se encontrar dentro da fase exponencial na curva de amplificação. O valor de  $C_T$  detectado é inversamente relacionado com a quantidade de fragmentos amplificados na reação (quanto menor o valor de  $C_T$ , maior a quantidade de fragmentos) (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008; DINON, 2011). Assim, quanto maior a quantidade inicial da sequência alvo, mais cedo ocorre um aumento significativo da fluorescência e mais baixo será o valor de  $C_T$  (WEIGHARDT et al., 2004).

A análise dos dados obtidos por qPCR pode ser feita de duas maneiras: por quantificação absoluta ou quantificação relativa. A quantificação absoluta determina o número de cópias inicial do transcrito de interesse, usualmente relacionando com uma curva padrão interna ou externa. Já a quantificação relativa descreve a mudança na expressão do gene alvo em determinado tratamento em relação a alguma condição de referência, como um controle não tratado ou uma amostra no tempo zero de tratamento, sendo utilizada, geralmente, para investigar mudanças fisiológicas (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

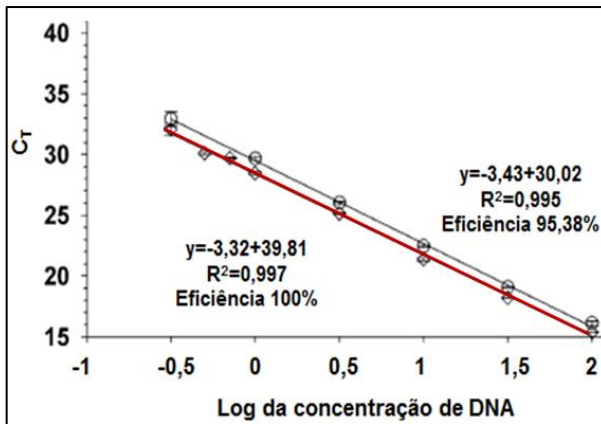
Para análise de expressão gênica por quantificação relativa, é indispensável a seleção de um gene de referência (controle interno ou normalizador), o qual pode ser um gene constitutivo, pois deve ser expresso em nível constante na maioria das células do organismo de estudo, mesmo em estágios de desenvolvimento diferentes ou em órgãos diferentes. Genes envolvidos em processos celulares básicos, como a manutenção da estrutura celular ou do metabolismo primário, são frequentemente escolhidos como normalizadores (ALMEIDA et al., 2010). Após a seleção, esse gene de referência deve ser adequadamente validado para cada experimento para certificar que a expressão gênica não é afetada pelo tratamento ou parâmetros experimentais (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

A quantificação relativa de transcritos obtidos por qPCR para calcular as variações na expressão gênica pode ser realizada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , onde  $\Delta\Delta C_T$  é  $(C_{T,\text{alvo}} - C_{T,\text{controle}})\text{tempo } x - (C_{T,\text{alvo}} - C_{T,\text{controle}})\text{tempo zero}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para o cálculo do  $\Delta\Delta C_T$  ser válido, as eficiências (E) de amplificação do gene alvo e do gene de referência devem ser aproximadamente iguais. O valor de E é determinado a partir de uma curva padrão feita pela diluição em série de uma amostra representativa de concentração conhecida (CIKOS et al., 2007). Esta curva padrão é feita tanto para o

gene alvo quanto para o gene de referência (controle), e as equações dessas retas vão determinar a similaridade das eficiências (Figura 1.12). Dessa forma, se o valor do coeficiente angular das retas for semelhante (*slope*), as eficiências serão similares e o cálculo do  $\Delta\Delta C_T$  pode ser utilizado para quantificação relativa do gene alvo. Uma eficiência de 100% corresponde a duplicação do cDNA a cada ciclo, o que seria ideal, entretanto é aceitável que o valor de eficiência esteja entre 90 e 110%. (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , os dados são apresentados em número de vezes que a expressão do gene alvo, normalizado para referência endógena, aumentou ou diminuiu na amostra tratada em relação à amostra controle não tratada (CIKOS et al., 2007).

**Figura 1.12** Gráfico representando curvas de validação de um gene de referência (linha vermelha) e um gene alvo (linha cinza) com suas respectivas equações,  $R^2$  e eficiências.



Os dados de expressão relativa podem também ser apresentados como  $C_T$  comparativo ou  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , onde  $\Delta C_T = (C_T \text{ alvo} - C_T \text{ controle})$ , quando não é considerado diferença entre as amostras (por exemplo, diferentes tempos ou tratamentos das amostras). Geralmente esses dados passam por transformação logarítmica, sendo possível apresentá-los apenas como  $\Delta C_T$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

É importante ressaltar que os resultados de quantificação podem variar drasticamente dependendo do método escolhido para a análise dos dados e que, as abordagens analíticas diferentes, podem levar a conclusões opostas (CIKOS et al., 2007). Assim sendo, a escolha da abordagem e do método é de importante para que os dados obtidos sejam apresentados de forma coerente e realística.

#### 1.4 QTL

Nos últimos anos, a caracterização funcional de genes e projetos de sequenciamento parcial ou integral do genoma tem facilitado o desenvolvimento de marcadores moleculares em plantas. Entre os principais marcadores desenvolvidos a partir dessas sequências estão os marcadores provenientes de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e de sequências de repetição simples (SSRs) (MACKAY; STONE; AYROLES, 2009; ASHRAFI et al., 2012). Esses marcadores possuem vantagens em relação a marcadores gerados randomicamente, ou seja, de regiões anônimas do genoma, uma vez que podem ser selecionados de acordo com a característica desejada, estando relacionados ao(s) gene(s) responsável pela característica de interesse. Os marcadores de DNA devem revelar diferenças genéticas, tornando-se ainda mais relevantes se essas diferenças forem entre linhagens da mesma espécie (VARSHNEY; GRANER; SORRELS, 2005).

Um dos principais usos de marcadores de DNA tem sido a construção de mapas para diversas culturas vegetais. Esses mapas são utilizados para identificar regiões cromossômicas que contêm genes que regulam características simples (um único gene) e características quantitativas. A região genômica que contém gene(s) associado(s) com uma característica quantitativa é conhecida como locus de característica quantitativa (QTL, *quantitative trait locus*). O processo de construção de mapa de marcadores associado com a análise de QTL é conhecido como mapeamento de QTL (COLLARD et al., 2005; HOLLAND, 2007).

O QTL, termo primeiramente determinado por Gelderman (1975), conceitualmente, pode ser um único gene ou um grupo de genes relacionados que afetam uma determinada característica. A análise de QTL, sendo usualmente realizada para mapeamento, tem por principal objetivo detectar a associação entre genótipos e fenótipos. Esses mapas são realizados para populações segregantes, como as populações F2, linhagens recombinantes (RILs), linhagens isogênicas (NILs) e

linhagens duplo-haploide (DHs) (SEMAGN; BJØRNSTAD; NDJIONDJOP, 2006; SEMAGN; BJØRNSTAD; XU, 2010). Para essas populações, as linhagens parentais devem apresentar diferenças em uma ou mais características de interesse. Uma população F<sub>2</sub>, derivada de híbridos F<sub>1</sub>, é a mais simples de ser desenvolvida para mapeamento, por ser de fácil construção/reprodução (autofecundação) em um curto espaço de tempo (ASÍNS, 2002). Através desses mapeamentos, estudos em genômica de plantas têm esclarecido várias vias metabólicas e revelado marcadores moleculares para características de interesse genômico (VARSHNEY; GRANER; SORRELS, 2005).

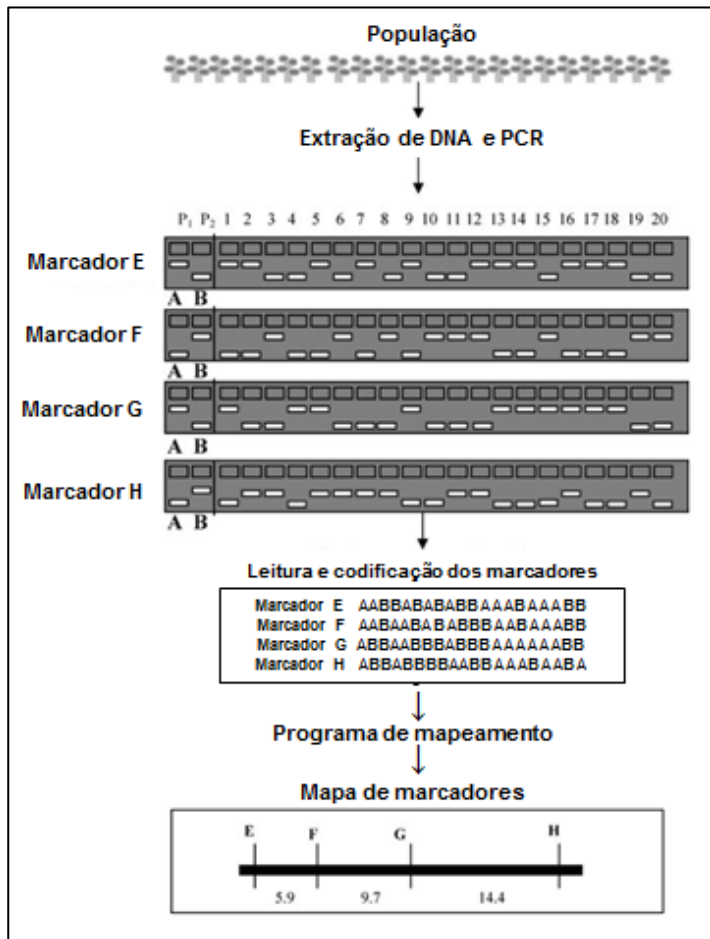
Para a construção de um mapa de marcadores e consequente análise de QTL, investiga-se a presença de polimorfismos nas linhagens parentais. Uma vez que esses polimorfismos foram detectados, eles são utilizados para um *screening* na população segregante (F<sub>2</sub>, incluindo linhagens parentais e híbridos F<sub>1</sub>), conhecido como genotipagem de marcadores (COLLARD et al., 2005). Os dados de genotipagem são, submetidos a um software para a construção de um mapa de marcadores. Um esquema representativo da construção de um mapa de marcadores a partir de uma população segregante pode ser visto na Figura 1.13.

Considerando que o mapeamento de QTLs é realizado a partir de um mapa de marcadores genéticos, que apresenta a posição e a distância genética relativa entre marcadores no cromossomo, esse mapeamento baseia-se no princípio de que tanto genes quanto marcadores segregam através de recombinação cromossômica (*crossing-over*). Isso explica o fato de os polimorfismos selecionados não estarem distribuídos igualmente nos cromossomos, mas agrupados em algumas regiões e ausentes em outras (COLLARD et al., 2005; MACKAY; STONE; AYROLES, 2009).

Os maiores objetivos de mapeamento de QTL são a identificação de regiões do genoma que afetam a característica de interesse e a análise do efeito do QTL na característica, como: quanto da variação na característica é causada por esta região específica; se o gene associado ao QTL tem efeito aditivo ou dominante; qual alelo está associado com o efeito favorável (DOERGE, 2002).



**Figura 1.13** Esquema representando a construção de um mapa de marcadores genéticos a partir de uma população segregante F<sub>2</sub> (amostras de 1 a 20 na genotipagem dos marcadores E, F, G e H). Alelos da linhagem parental P1 estão simbolizados como ‘A’ e da linhagem parental P2, como ‘B’.



Fonte: Collard et al. (2005).

Para estipular a significância do mapeamento de QTL, é calculada a correlação com os marcadores, a qual utiliza a razão de chances de ocorrência (razão entre presença e ausência de correlação). Essa razão é mais convenientemente expressa em logaritmo, sendo chamada de LOD (*logarithm of odds*). Valores  $>3$  são utilizados na construção de mapas, uma vez que esse valor indica que há 1000 vezes mais chance da presença de correlação com o marcador do que sua ausência (VAN OOIJEN, 2009).

Analisando os níveis de expressão de um gene ou de grupos de genes em uma população segregante é possível mapear a herança do padrão de expressão através da análise de QTL de expressão (eQTLs) (VARSHNEY; GRANER; SORRELS, 2005). Os eQTLs representam um campo emergente da genômica, onde os níveis de transcrição funcionam como fenótipos que são mapeados como locus controladores de características quantitativas (HOLLOWAY; LI, 2010). Por outro lado, a combinação da metabolômica com análise genética ajuda a identificar regiões genômicas que estão associados com um aumento ou diminuição dos níveis de metabólitos, essas regiões constituem-se nos QTLs de metabólitos (mQTLs) (WAHYUNI et al., 2013). Para isso, os dados de um perfil metabólico relacionado a um grupo de compostos de interesse é submetido à análise de correlação com o mapa de marcadores genéticos.

Neste contexto, estudos de mapeamento de QTL têm sido reportados em diferentes culturas para diversas características, incluindo rendimento, qualidade, resistência a doenças e insetos, tolerância a estresse biótico e adaptação ambiental. Em milho foram encontrados, por exemplo, QTLs para adaptação à seca (RIBAUT; RAGOT, 2007) e para resistência a fungos (ALI et al., 2005); em maçã, foi identificado QTL para textura e qualidade dos frutos (KENIS; KEULEMANS; DAVEY, 2008; LONGHI et al., 2012; 2013); em feijão, foram encontrados QTLs para resistência a *Fusarium* (SCHNEIDER; GRAFTON; KELLY, 2001). Na família das solanáceas, podem ser relatados o mapeamento de QTLs para características agrônomicas (incluindo rendimento e qualidade) e QTL relacionado à senescência em batata (BRADSHAW et al., 2008; HURTADO et al., 2012); em berinjela, foram descritos QTLs relacionados a características morfológicas, bem como QTL para pigmentação por antocianinas (FRARY et al., 2003; BARCHI et al., 2012); em tomate, já foram identificados QTL afetando o nível de ácido ascórbico em frutos (STEVENS et al., 2007), também QTL relacionado ao tamanho e composição do fruto (CAUSSE et al., 2004). Ben-Chaim e

colaboradores (2006), por sua vez, revelaram o mapeamento de QTLs para tamanho e formato dos frutos de tomate e pimenta. Além disso, em pimentas foram também identificados QTLs para diferentes características, tais como resistência a doenças, características sensoriais como a pungência, bem como QTLs relacionados a características dos frutos (RAO et al., 2003; ZYGIER et al., 2005; LEE et al., 2010; BOROVSKY; PARAN, 2011; ALIMMI et al., 2013). Brand et al. (2012), por exemplo, mostraram que *pc8.1* e *pc10.1* são os QTLs responsáveis pelo controle dos níveis de clorofila em pimenta.

Embora a pimenta venha sendo usada como organismo modelo, há uma quantidade limitada de informações genéticas, como a identificação de marcadores moleculares. Isto se deve, primeiramente, a não disponibilidade da sequência genômica de pimenta, a qual é esperada para os próximos anos (PARK et al., 2012). Entretanto, nas duas últimas décadas, uma variedade de marcadores moleculares (AFLP, RFLP, SSR e RAPD) tem sido desenvolvida e aplicada para mapeamento em populações derivadas de muitos cruzamentos intra e interespecíficos de pimentas (PARAN et al., 2004; WU et al., 2009).

Dessa maneira, a análise genética, incluindo a identificação de marcadores moleculares com mapeamento e análise de QTL para expressão gênica, bem como para dados metabólicos pode ajudar a elucidar as vias metabólicas biossintéticas de interesse, como, por exemplo, a via de síntese dos flavonoides em diferentes plantas, como em frutos de pimenta.



## CAPÍTULO 2

### REGULAÇÃO POR ÓXIDO NÍTRICO DA TRANSCRIÇÃO DE GENES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO E À SÍNTESE DE GLUTATIONA EM FOLHAS DE *Zea mays*

Artigo publicado:

HERMES, V.S.; DALL'ASTA, P.; AMARAL, F.P.; ANACLETO, K.B.; ARISI, A.C.M. The regulation of transcription of genes related to oxidative stress and glutathione synthesis in *Zea mays* leaves by nitric oxide. ***Biologia Plantarum***, vol. 57, n.4, p.620-26, 2013.

## 2. THE REGULATION OF TRANSCRIPTION OF GENES RELATED TO OXIDATIVE STRESS AND GLUTATHIONE SYNTHESIS IN *Zea mays* LEAVES BY NITRIC OXIDE

V.S. HERMES, P. DALL'ASTA, F.P. AMARAL, K.B. ANACLETO, and A.C.M. ARISI\*

*Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001, Florianópolis-SC, Brazil*

### Abstract

Apocynin was used as an inducer of nitric oxide (NO) synthesis in leaves of two maize (*Zea mays* L.) cultivars (SHS 3031 and DKB 240). The transcription of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -*ecs*), glutathione synthetase (*gshs*), chalcone synthase (*chs*), flavanone 3- $\beta$ -hydroxylase (*fht1*), glutathione S-transferase (*gst23*), ascorbate peroxidase (*apx1*, *apx2*), catalase (*cat1*, *cat3*), and superoxide dismutase (*sod2*) genes were quantified in leaves of maize and NO presence was detected by fluorescence microscopy. An increase in the fluorescence after apocynin treatment was not observed in leaves of DKB 240 but leaves of SHS 3031 showed higher fluorescence after 6 and 12 h of apocynin treatment. We observed that  $\gamma$ -*ecs*, *apx1*, *cat1*, and *sod2* transcription increased after 24 h of apocynin treatment in SHS 3031.

*Additional key words:* antioxidants, apocynin, gene expression, maize, qRT-PCR.

*Received* 21 December 2012, *accepted* 22 April 2013.

*Abbreviations:* APO - apocynin; *apx* - gene encoding ascorbate peroxidase; *cat* - gene encoding catalase; *chi* - gene encoding chalcone isomerase; *chs* - gene encoding chalcone synthase; cPTIO - 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide; DAF-FM DA - 4,5-diaminofluorescein diacetate; *fht* - gene encoding flavanone 3- $\beta$ -hydroxylase;  $\gamma$ -*ecs* - gene encoding  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase; GSH - glutathione; *gshs* - gene encoding glutathione synthetase; *gst* - gene encoding glutathione S-transferase; qRT-PCR - quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; ROS - reactive oxygen species; SNP - sodium nitroprusside; *sod* - gene encoding superoxide dismutase.

*Acknowledgements:* The present study was financially supported by CNPq process 471017/2010-8 and CNPq INCT FBN Biological Nitrogen Fixation. VSH was the recipient of PhD fellowship from CNPq, Ministry of Science and Technology, Brazil. FPA and PD were the recipients of fellowships from CAPES, Ministry of Education, Brazil. ACMA is recipient of research fellowship (PQ-2) from CNPq. We would like to express our gratitude to Chirle Ferreira, FluorBEG, BEG, Universidade Federal de Santa Catarina, for fluorescence microscope facilities.

\* Corresponding author: fax: (+55) 4837219943, e-mail: ana.arisi@ufsc.br

## 2.1 Introduction

Nitric oxide acts as a key signaling molecule in many plant processes including responses to drought and salinity (ZENG et al., 2011). Large-scale gene expression analysis has identified many NO-responsive genes that are related to stress, plant defense, and hormonal responses (MOREAU et al., 2010). NO-induced long term UV-B protection in maize requires a functional *ZmP* gene. *ZmP* encodes a MYB-like transcriptional factor that activates chalcone synthase (*chs*) and chalcone isomerase (*chi*) genes involved in the flavonoid biosynthesis. In maize leaves, *ZmP*, *chs*, and *chi* expressions are up-regulated by UV-B in a NO-dependent manner (TOSSI et al., 2011).

Exogenous NO stimulates glutathione (GSH) synthesis in plants (INNOCENTI et al., 2007; MELLO et al., 2012) that occurs in two ATP-dependent steps catalyzed by  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -ECS) and glutathione synthetase (GSHS). It was shown that  $\gamma$ -*ecs* and *gshs* genes are up-regulated by NO treatment in *Medicago truncatula* (INNOCENTI et al., 2007; MEILHOC et al., 2011). Many GSH functions are linked to reversible redox reactions of the cysteine sulfur group (NOCTOR et al., 2002; FOYER; NOCTOR, 2005). GSH conjugates with a vast range of endogenous compounds and xenobiotics via glutathione S-transferase (GST) rendering them less reactive and more water-soluble and thus more tractable for vacuolar sequestration (WISSER et al., 2011) or transport. GSH interacts with NO forming S-nitrosoglutathione, a potential signaling molecule or a reservoir of NO (BAUDOIN, 2011).

Apocynin is used as an inducer of NO synthesis in maize leaves (TOSSI; LAMATTINA; CASSIA, 2009). To investigate whether the NO induced by apocynin can interfere with glutathione metabolism, the transcription of *γ-ecs*, *gshs*, and *gst23* (encoding a type III GST; McGONIGLE et al., 2000) were analyzed in leaves of maize cvs. DKB 240 and SHS 3031. We also analyzed transcript amounts of *chs* and flavanone 3-β-hydroxylase (*flh1*), both involved in flavonoid synthesis (DEBOO; ALBERTSEN; TAYLOR, 1995; LILLO; LEA; RUOFF, 2008). To investigate the effects of NO-induced by apocynin on gene expression related to oxidative stress response, ascorbate peroxidase (*apx1*, *apx2*), catalase (*cat1*, *cat3*), and superoxide dismutase (*sod2*) transcript levels were analyzed in leaves of SHS 3031 in this work.

## 2.2 Materials and methods

Maize (*Zea mays* L. cvs. DKB 240 and SHS 3031) seeds were germinated on water-saturated paper at 25 °C in a dark chamber for 3 d. Germinated seedlings were transferred to soil and kept in a growth chamber for 7 d (a 14-h photoperiod, irradiance of 150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, temperature of 25 °C, and relative humidity of 70 %) and watered daily. The seedlings were carefully excised at the base of stem and placed in distilled water for 1 h. Then, the seedlings were transferred to water (control treatment, H<sub>2</sub>O), 100 μM apocynin (4-hydroxy-3-methoxyacetophenone, APO), or 100 μM apocynin combined with 100 μM 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO). After 0, 2, 6, 12, and 24 h, the second leaves were sampled, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C for further analyses. Three independent experiments (biological replicates) were performed.

NO presence was detected according to Tossi, Lamattina and Cassia (2009). The leaf sections were placed in a solution of 5 μM 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-FM DA) (*Sigma*, St. Louis, USA) in the dark under constant agitation for 30 min. Then, the sections were washed in

2.5 mM HEPES buffer (pH 6.0) 3 times, each washing lasting 15 min, to remove the probe excess. The green fluorescence was visualized in *Olympus BX41* microscope (*Olympus*, Tokyo, Japan) and acquired images were analyzed using *QCapture PRO 5.1 (QImaging*,



Surrey, Canada). The samples of zero time (1-h treatment in distilled water) were used as controls showing the basal levels of NO.

For the RNA isolation, three plants of each treatment and of each biological replicate were used, so nine isolated RNAs were prepared for each condition. The total RNA was isolated from approximately 100 mg of leaf tissue using *RNeasy*® mini kit (*Qiagen*, Chatsworth, CA, USA) according to the instructions supplied by the manufacturer. RNA samples were treated with DNase I amplification grade (*Sigma*) to eliminate DNA contamination. RNA was quantified by the *Nanodrop 2000* spectrophotometer (*Thermo Fisher Scientific*, Wilmington, DE, USA). After quantification, reverse transcription was performed using 2 µg of RNA oligo(dT) primer and high capacity cDNA archive kit (*Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

The *Primer Express*™ v. 3.0 software (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) was used to design the specific oligonucleotides for real-time PCR (Table 2.1). To determine amplification efficiencies, cDNA of a control sample (water treatment) was serially diluted with water (5-fold dilution from 100 ng to 0.16 ng of cDNA template) and relative standard curves of each target gene were compared to the constitutive gene (*α-tubulin*) in triplicate. Amplification efficiencies were determined using the following equation: efficiency =  $10^{(-1/\text{slope})} - 1$ , where the slope is the value obtained from the standard curve. The sample reactions were performed using *SYBR Green PCR Master Mix 2X* (*Life Technologies*) and 40 ng of template cDNA. Amplification reactions of samples were carried out in duplicate in adjacent wells on the same plate, at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Immediately after each run, a dissociation curve was carried out, with linear increase from 60 to 95 °C, performed on an *ABI PRISM*™ 7500 detection system (*Life Technologies*). The transcript quantifications of *γ-ecs*, *gshs*, *chs*, *act*, *fht1*, *gst23*, *apx1*, *apx2*, *cat1*, *cat3*, and *sod2* were performed in relation to *α-tubulin* (a reference gene) and they were calculated by  $\Delta\Delta\text{CT}$  method (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Changes in transcript amounts were analyzed by non-parametric Kruskal-Wallis test and compared by Student *t*-test ( $P < 0.05$  for significant differences). Statistical analysis was performed using the *R software* v. 2.12.1 (<http://www.R-project.org/>).

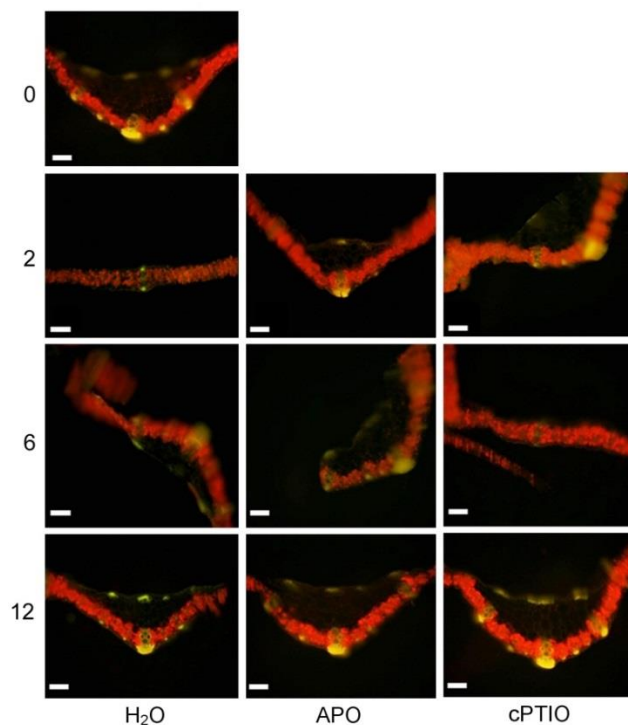
**Table 2.1** Primer forward (F) and reverse (R) sequences and concentrations used in qRT-PCR analysis for *Zea mays* transcript quantification.

Genes	Primers	Concentration [nM]	Fragment length [bp]	Accession No.
<i>α-tubulin</i>	F GCGCACCATCCAGTTTCGT	300	60	X73980
	R CTGGTAGTTGATTCCGCAC TTG	300		
<i>γ-glutamylcysteine synthetase</i>	F TTCTTGGGCTTGGCTTCA	300	62	AJ302783
	R TCCCTTTGGCATTATTGGTATGT	300		
<i>glutathione synthetase</i>	F GCTCCCAGCACATTTTCCA	300	99	AJ302784
	R GAAATTCCCGTCCATGCTAACA	300		
<i>chalcone synthase</i>	F CGTCCGTCCGCAAATAATGT	300	99	CA851897
	R ATGATGATTGTGCGACTGACAGT	300		
<i>actin1</i>	F GCAGCATGAAGGTTAAAAGTGATTG	300	61	NM_001155179.1
	R GCCACCGATCCAGACACTGT	300		
<i>flavanone 3-β-hydroxylase</i>	F CAGCAGAGTGCCAAACAAGGA	500	72	U04434.1
	R CCCTCTACCATATCAGGCAAAAA	500		
<i>glutathione S-transferase 23</i>	F GGCTAGTAATTCTGGAGCAGCTAGTT	500	76	NM_001111524.1
	R GCAAAAAGTGCAACCAAGTCCTTA	500		
<i>ascorbate peroxidase 1</i>	F CACCTCAAGCTCTCCGAAGCTG	500	63	NM_001156720.1
	R GTCCCGCTCCAGGATATGG	100		
<i>ascorbate peroxidase 2</i>	F AGGCCTTCTGCAGTACCAA	500	58	NM_001112030.1
	R TGGGCGGAAGGATGGAT	100		
<i>catalase 1</i>	F GATGGGTTGACGCACTGACA	500	60	NM_001111945.1
	R AGATCCAAATGGTACGGTGTTC A	300		
<i>catalase 3</i>	F TCGCTCGGACACCCAAAG	500	59	NM_001111946.1
	R GGCGAGGAGGTCTATCCAGAT	500		
<i>superoxide dismutase 2</i>	F CAGAGACAATGGTGAAGGCAGTT	500	61	M54936.1
	R TGATGTCAAGGGCACCATCTT	100		

### 2.3 Results

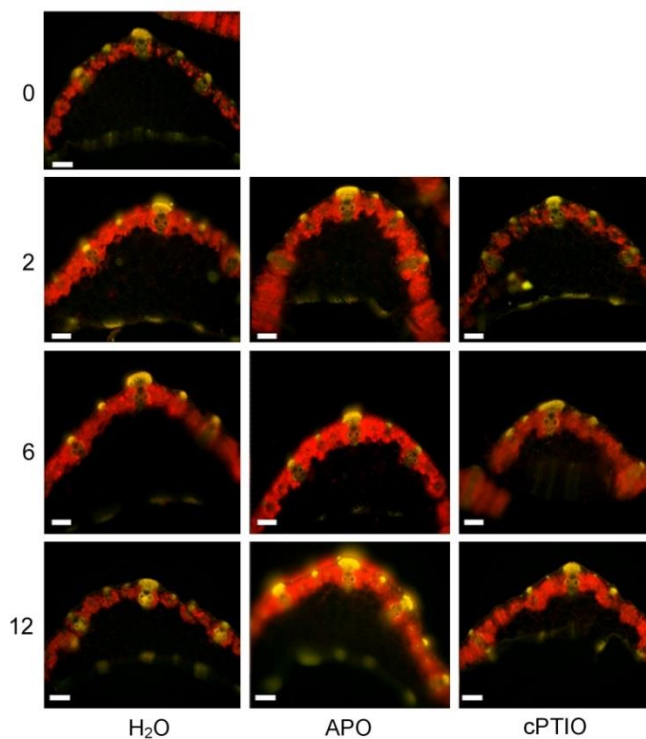
Leaves of maize cvs. SHS 3031 and DKB 240 were treated with water, NO inducer apocynin, or apocynin plus cPTIO, a NO scavenger. After 2 h of the apocynin treatment, differences in fluorescence were not observed in both cvs. After 6 and 12 h of the apocynin treatment, higher fluorescence was observed in leaves of SHS 3031 but not in DKB 240 compared to water treated leaves. The SHS 3031 samples treated with apocynin combined with cPTIO presented lower fluorescence than those treated only with apocynin (Figs. 2.1, 2.2).

**Figure 2.1** NO visualization by fluorescence microscopy in transversal sections of *Zea mays* DKB 240 leaves (midrib) loaded with DAF-FM DA. Leaf samples treated for 0, 2, 6, and 12 h with water (H<sub>2</sub>O), apocynin (APO), APO plus cPTIO. Scale bar 100  $\mu$ m.



The transcription of *γ-ecs*, *gshs*, *chs*, *fht1*, and *gst23* after the apocynin, apocynin plus cPTIO, and water treatments were analyzed in leaves of DKB 240 and SHS 3031 whereas the transcription of two ascorbate peroxidase genes (*apx1*, *apx2*), two catalase genes (*cat1*, *cat3*), and one superoxide dismutase gene (*sod2*) were analyzed only in leaves of SHS 3031. The amplification efficiencies were in the range of 90 - 110 % (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Regarding DKB 240, increases in *γ-ecs* transcript amounts were observed after 24 h of the apocynin treatment and addition of cPTIO did not abolish this observed increase (Table 2.2). For SHS 3031, 2-fold and 2.6-fold increases in *γ-ecs* and *act* transcript amounts were observed, respectively, 24 h after the apocynin treatment compared to the water treatment, but these increases were suppressed by cPTIO presence (Table 2.3). Regarding oxidative stress response genes in SHS 3031, *apx1* decreased 0.6-fold after 12 h of the apocynin treatment whereas 2-fold increase in *apx1*, *cat1*, and *sod2* transcription was observed 24 h after the apocynin treatment, and these changes were also suppressed by cPTIO (Table 2.4). Regarding *chs*, *fht1*, and *gst23*, transcript amounts were not statistically different after apocynin treatment for both maize cultivars (Tables 2.2 and 2.3).

**Figure 2.2** NO visualization by fluorescence microscopy in transversal sections of *Zea mays* SHS 3031 leaves (midrib) loaded with DAF-FM DA. Leaf samples treated for 0, 2, 6, and 12 h with water (H<sub>2</sub>O), apocynin (APO), APO plus cPTIO. Scale bar 100  $\mu$ m.



**Table 2.2** Relative expression of *γ-ecs*, *gshs*, *chs*, *act*, *fmt1*, and *gst23* in *Zea mays* DKB 240 leaves. Leaf samples of 10-d-old seedlings were treated for 2, 6, 12, and 24 h with H<sub>2</sub>O, APO, and APO plus cPTIO. Relative content of transcripts were calculated by qRT-PCR using the  $\Delta\Delta CT$  method and  $\alpha$ -tubulin as a reference gene. Means  $\pm$  SD,  $n = 9$ . Values followed by different letters in the column are significantly different at  $P < 0.05$  according to the Kruskal-Wallis test.

Time [h]	Treatment	<i>γ-ecs</i>	<i>gshs</i>	<i>chs</i>	<i>act</i>	<i>fmt1</i>	<i>gst23</i>
2	H <sub>2</sub> O	1.15 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	1.20 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>	1.13 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	1.11 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	2.91 $\pm$ 4.38 <sup>a</sup>	1.03 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>
	APO	3.20 $\pm$ 3.47 <sup>a</sup>	1.44 $\pm$ 1.26 <sup>a</sup>	6.03 $\pm$ 10.79 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	5.31 $\pm$ 7.53 <sup>a</sup>	3.66 $\pm$ 6.08 <sup>a</sup>
	cPTIO	5.42 $\pm$ 7.50 <sup>a</sup>	1.74 $\pm$ 1.84 <sup>a</sup>	7.04 $\pm$ 11.36 <sup>a</sup>	2.54 $\pm$ 3.97 <sup>a</sup>	9.12 $\pm$ 9.45 <sup>a</sup>	4.40 $\pm$ 7.95 <sup>a</sup>
6	H <sub>2</sub> O	1.14 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	1.07 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	1.13 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	1.14 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	1.51 $\pm$ 1.65 <sup>a</sup>	2.07 $\pm$ 2.76 <sup>a</sup>
	APO	0.81 $\pm$ 0.27 <sup>ab</sup>	1.13 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	1.69 $\pm$ 0.90 <sup>a</sup>	0.97 $\pm$ 0.77 <sup>a</sup>	2.55 $\pm$ 2.20 <sup>a</sup>	0.75 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>
	cPTIO	0.59 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	1.04 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>	0.98 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	1.21 $\pm$ 1.47 <sup>a</sup>	1.88 $\pm$ 2.32 <sup>a</sup>	2.26 $\pm$ 4.46 <sup>a</sup>
12	H <sub>2</sub> O	1.15 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	1.35 $\pm$ 1.09 <sup>a</sup>	1.12 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	0.84 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	0.88 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	1.81 $\pm$ 1.71 <sup>a</sup>
	APO	0.94 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	1.81 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup>	1.32 $\pm$ 0.93 <sup>a</sup>	0.81 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup>	1.04 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	0.89 $\pm$ 0.90 <sup>a</sup>
	cPTIO	0.87 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	1.34 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	1.09 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	0.71 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	1.17 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>	0.74 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>
24	H <sub>2</sub> O	1.08 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>	1.08 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	1.29 $\pm$ 1.18 <sup>a</sup>	0.96 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	1.55 $\pm$ 2.03 <sup>a</sup>	1.59 $\pm$ 1.99 <sup>a</sup>
	APO	1.74 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	1.44 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>	1.26 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	1.40 $\pm$ 1.10 <sup>a</sup>	1.30 $\pm$ 1.11 <sup>a</sup>	1.16 $\pm$ 1.07 <sup>a</sup>
	cPTIO	1.36 $\pm$ 0.55 <sup>ab</sup>	0.64 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	1.24 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>	1.07 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	0.61 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	0.98 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>

**Table 2.3** Relative expression of *γ-ecs*, *gshs*, *chs*, *act*, *fht1*, and *gst23* in *Zea mays* SHS 3031 leaves. Leaf samples of 10-d-old seedlings were treated for 2, 6, 12, and 24 h with H<sub>2</sub>O, APO, and APO plus cPTIO. Relative content of transcripts were calculated by qRT-PCR using the  $\Delta\Delta$ CT method and  $\alpha$ -tubulin as a reference gene. Means  $\pm$  SD,  $n = 9$ . Values followed by different letters in the column are significantly different at  $P < 0.05$  according to the Kruskal-Wallis test.

Time [h]	Treatment	<i>γ-ecs</i>	<i>gshs</i>	<i>chs</i>	<i>act</i>	<i>fht1</i>	<i>gst23</i>
2	H <sub>2</sub> O	0.92 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	1.21 $\pm$ 1.00 <sup>a</sup>	1.38 $\pm$ 1.18 <sup>a</sup>	1.16 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	2.28 $\pm$ 2.41 <sup>a</sup>	1.36 $\pm$ 0.93 <sup>a</sup>
	APO	0.89 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	1.17 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	2.06 $\pm$ 2.07 <sup>a</sup>	1.38 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	1.12 $\pm$ 1.49 <sup>a</sup>	1.25 $\pm$ 1.01 <sup>a</sup>
	cPTIO	0.85 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	1.27 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	2.51 $\pm$ 3.33 <sup>a</sup>	2.87 $\pm$ 2.69 <sup>a</sup>	4.81 $\pm$ 6.35 <sup>a</sup>	4.15 $\pm$ 5.06 <sup>a</sup>
6	H <sub>2</sub> O	1.05 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	1.03 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	1.27 $\pm$ 0.90 <sup>a</sup>	1.04 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	2.70 $\pm$ 4.18 <sup>a</sup>	1.44 $\pm$ 1.33 <sup>a</sup>
	APO	3.40 $\pm$ 2.44 <sup>a</sup>	2.38 $\pm$ 2.12 <sup>a</sup>	3.85 $\pm$ 3.57 <sup>a</sup>	1.38 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>	16.58 $\pm$ 30.09 <sup>a</sup>	1.53 $\pm$ 1.24 <sup>a</sup>
	cPTIO	2.11 $\pm$ 1.50 <sup>a</sup>	3.70 $\pm$ 7.71 <sup>a</sup>	1.31 $\pm$ 1.03 <sup>a</sup>	1.56 $\pm$ 1.00 <sup>a</sup>	3.79 $\pm$ 6.90 <sup>a</sup>	4.23 $\pm$ 6.95 <sup>a</sup>
12	H <sub>2</sub> O	1.27 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>	1.21 $\pm$ 0.77 <sup>a</sup>	2.25 $\pm$ 3.05 <sup>a</sup>	1.18 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>	4.40 $\pm$ 6.66 <sup>a</sup>	1.73 $\pm$ 1.76 <sup>a</sup>
	APO	1.37 $\pm$ 1.04 <sup>a</sup>	1.79 $\pm$ 1.54 <sup>a</sup>	0.63 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	0.81 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	0.65 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>	1.25 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>
	cPTIO	1.50 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>	3.16 $\pm$ 4.96 <sup>a</sup>	1.15 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>	1.44 $\pm$ 0.86 <sup>a</sup>	14.48 $\pm$ 19.59 <sup>a</sup>	3.92 $\pm$ 4.08 <sup>a</sup>
24	H <sub>2</sub> O	1.12 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	1.12 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	1.69 $\pm$ 1.84 <sup>a</sup>	1.16 $\pm$ 0.76 <sup>b</sup>	2.62 $\pm$ 3.71 <sup>a</sup>	1.35 $\pm$ 1.30 <sup>a</sup>
	APO	2.11 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup>	1.45 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	2.59 $\pm$ 4.31 <sup>a</sup>	2.59 $\pm$ 1.79 <sup>a</sup>	20.63 $\pm$ 36.79 <sup>a</sup>	4.35 $\pm$ 6.27 <sup>a</sup>
	cPTIO	1.23 $\pm$ 0.87 <sup>b</sup>	1.20 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	0.82 $\pm$ 0.77 <sup>a</sup>	0.99 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup>	2.39 $\pm$ 2.91 <sup>a</sup>	4.15 $\pm$ 5.40 <sup>a</sup>

## 2.4 Discussion

Apocynin was used in a study of the NO functionality in plants. It is methoxy-substituted catechol able to raise the steady-state level of NO in maize, and this compound, a NADPH oxidase inhibitor, induces the accumulation of endogenous NO through a nitric oxide synthase (NOS)-like activity (TOSSI; LAMATTINA; CASSIA, 2009; TOSSI; CASSIA; LAMATTINA, 2009). Thus, an increase in the NO fluorescence due to the reaction between DAFFM DA and NO is expected in the samples treated with apocynin. On the other hand, the NO scavenger cPTIO should cause a decrease in the fluorescence in the samples treated with apocynin plus cPTIO. The NO detection by microscopy through the diaminofluorescein reaction was commonly used to visualize NO in many previous studies (CREUS et al., 2005; ARASIMOWICZ-JELONEK; FLORYSZAK-WIECZOREK; KUBIS, 2009; LOMBARDI et al., 2010; CORPAS et al., 2011; TOSSI et al., 2011).

In a previous study with leaves of maize cv. SHS 3031, we applied apocynin as NO inducer and sodium nitroprusside (SNP) as NO donor, and an increase in fluorescence was observed after 12 h of NO treatments (MELLO et al., 2012). A time-course experiment of endogenous NO production in maize cv. N107B leaves treated with 100  $\mu\text{M}$  apocynin, the same concentration as used in our study, shows increased fluorescence already after 2 h of the treatment, however, after 24 h of the treatment, NO diffuses over the whole leaf (TOSSI; LAMATTINA; CASSIA, 2009). In our work, it is shown that apocynin is able to induce the endogenous NO production after 6-h treatment reaching the maximum fluorescence after 12 h in the leaves of cv. SHS 3031 (Fig. 2.2) whereas we did not observe any fluorescence increase in the cv. DKB 240 (Fig. 2.1). These differences could be related to different adaptive responses to environmental stresses between these two maize cultivars.



**Table 2.4** Relative expression of *apx1*, *apx2*, *cat1*, *cat3*, and *sod2* in *Zea mays* SHS 3031 leaves. Leaf samples of 10-d-old seedlings were treated for 2, 6, 12, and 24 h with H<sub>2</sub>O, APO, APO plus cPTIO. Relative content of transcripts were calculated by qRT-PCR using the  $\Delta\Delta$ CT method and  $\alpha$ -tubulin as a reference gene. Means  $\pm$  SD,  $n = 9$ . Values followed by different letters in the column are significantly different at  $P < 0.05$  according to the Kruskal-Wallis test.

Time [h]	Treatment	<i>apx1</i>	<i>apx2</i>	<i>cat1</i>	<i>cat3</i>	<i>sod2</i>
2	H <sub>2</sub> O	1.14 $\pm$ 0.66 <sup>ab</sup>	1.39 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	1.14 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	1.58 $\pm$ 1.33 <sup>a</sup>	1.09 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>
	APO	0.86 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	1.43 $\pm$ 1.14 <sup>a</sup>	1.11 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	3.22 $\pm$ 2.87 <sup>a</sup>	0.96 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>
	cPTIO	2.03 $\pm$ 1.67 <sup>a</sup>	2.15 $\pm$ 1.98 <sup>a</sup>	3.00 $\pm$ 5.24 <sup>a</sup>	3.50 $\pm$ 3.13 <sup>a</sup>	1.69 $\pm$ 1.29 <sup>a</sup>
6	H <sub>2</sub> O	1.06 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	1.03 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	1.12 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	1.31 $\pm$ 1.04 <sup>a</sup>	1.06 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>
	APO	0.87 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	1.30 $\pm$ 0.77 <sup>a</sup>	1.67 $\pm$ 1.00 <sup>a</sup>	2.05 $\pm$ 1.54 <sup>a</sup>	2.18 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>
	cPTIO	0.99 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	1.92 $\pm$ 2.27 <sup>a</sup>	2.50 $\pm$ 2.41 <sup>a</sup>	2.69 $\pm$ 1.97 <sup>a</sup>	2.21 $\pm$ 2.10 <sup>a</sup>
12	H <sub>2</sub> O	1.03 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	1.04 $\pm$ 0.32 <sup>ab</sup>	1.02 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	1.23 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	1.07 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>
	APO	0.66 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>	0.87 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	0.82 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	2.49 $\pm$ 4.15 <sup>a</sup>	1.21 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>
	cPTIO	1.27 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	1.46 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	1.15 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>	2.29 $\pm$ 1.45 <sup>a</sup>	1.71 $\pm$ 0.79 <sup>a</sup>
24	H <sub>2</sub> O	1.05 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>	1.07 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	1.11 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	1.04 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	1.05 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>
	APO	2.03 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>	1.79 $\pm$ 1.04 <sup>a</sup>	1.82 $\pm$ 1.18 <sup>a</sup>	1.21 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>	1.88 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>
	cPTIO	1.56 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	0.91 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	0.93 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup>	0.93 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	1.21 $\pm$ 1.17 <sup>b</sup>

Moreover, as a control for NO detection, the SHS 3031 leaves were treated with apocynin plus cPTIO and these samples presented lower fluorescence compared to samples treated only with apocynin. These results are in agreement with previous data showing cPTIO as an efficient NO scavenger (MODOLO et al., 2006; AHLFORS et al., 2009; TOSSI; CASSIA; LAMATTINA, 2009; DE OSTI et al., 2010; KOVACIK et al., 2010).

There is evidence that NO regulates gene expressions (LOMBARDI et al., 2010). NO activates signaling pathways resulting in changes in gene expressions through intermediate cellular messengers (TOSSI et al., 2011). Furthermore, nuclear regulatory proteins are affected by NO, since the S-nitrosylation of proteins is an important mechanism in regulation of the function of transcription factors (LINDERMAYR et al., 2005; SERPA et al., 2007).

Regarding the glutathione synthesis related genes,  $\gamma$ -*ecs* transcription was increased after 24 h of apocynin treatment (Table 2.3). The stimulation of GSH synthesis by NO was shown in *Medicago truncatula*, where the amounts of  $\gamma$ -*ecs* and *gshs* transcripts increase following SNP treatment (INNOCENTI et al., 2007). The NO accumulation increases  $\gamma$ -ECS activity and the total glutathione content in *Agropyron cristatum* leaves under water stress (SHAN et al., 2012). In our previous study with *Zea mays* SHS 3031 leaves, we showed that  $\gamma$ -*ecs* transcript amount was increased 12 h after SNP treatment. In this previous work, we measured  $\gamma$ -*ecs* transcript amounts only 12 h after apocynin treatment (MELLO et al., 2012), and it was not changed compared to water treatment. Similar results were obtained in this work (Table 2.3). We observed that the exogenous NO produced by SNP (MELLO et al., 2012) and endogenous NO induced by apocynin induced  $\gamma$ -*ecs* expression in different time courses, after 12 h and 6 h, respectively. SNP and apocynin treatments caused changes of  $\gamma$ -*ecs* expression in maize leaves.

Concerning the genes coding oxidative stress response enzymes, transcription of *apx1*, *cat1*, and *sod2* increased (2-fold) after 24 h of apocynin treatment in the SHS 3031 leaves (Table 2.4) which is in agreement with previous work showing increase in the transcript amounts and the total activities of antioxidant enzymes CAT and APX induced by SNP, and these changes were substantially arrested by the pre-treatment with cPTIO (ZHANG et al., 2007). Our results strengthen the induction of antioxidant enzyme expressions, once a NO inducer has been used instead of a NO donor. It is necessary to confirm the observed changes by using different NO modulator compounds

(ARASIMOWICZ-JELONEK; FLORYSZAK-WIECZOREK;  
KOSMALA, 2011).

Several putative NO-responsive genes have been identified in plant tissues and cell suspensions with altered transcription. A significant part of these genes encode proteins related to plant adaptive responses to biotic and abiotic stresses (BESSON-BARD et al., 2009). In leaves of the apocynin-responsive maize cv. SHS 3031, NO presence was revealed by fluorescence microscopy and we observed increases of transcription of *γ-ecs*, *apx1*, *cat1*, and *sod2* 24 h after the treatment. Our data confirm the emerging picture that NO acts as a signal involved in the plant adaptive response to environmental stresses (BESSON-BARD et al., 2009) although differences in transcript amounts of other analyzed genes (*chs*, *fht1* and *gst23*) were not observed after the apocynin treatment of the maize leaves.



## CAPÍTULO 3

### MAPEAMENTO GENÉTICO DE METABÓLITOS SEMI-POLARES EM FRUTOS DE PIMENTA (*Capsicum* sp) – ESCLARECENDO A REGULAÇÃO MOLECULAR DE QTLs DE FLAVONOIDES

Artigo publicado:

HERMES, V.S., WAHYUNI, Y., BALLESTER, A.R., DE VOS, R.H., VOORRIPS, R.E., MAHARIJAYA, A., MOLTHOFF, J., ZAMORA, M.V., SUDARMONOWATI, E., ARISI, A.C.M., BINO, R.J., BOVY, A.G. Genetic mapping of semi-polar metabolites in pepper fruits (*Capsicum* sp.): towards unravelling the molecular regulation of flavonoid quantitative trait loci. *Molecular Breeding*, vol. 33, p. 503-518, 2014.

### 3. GENETIC MAPPING OF SEMI-POLAR METABOLITES IN PEPPER FRUITS (*Capsicum* sp) – TOWARDS UNRAVELLING THE MOLECULAR REGULATION OF FLAVONOID QTLS

Vanessa Stahl-Hermes<sup>#a,c</sup>, Yuni Wahyuni<sup>#a,b</sup>, Ana-Rosa Ballester<sup>a,h</sup>, Ric C.H. de Vos<sup>d,f</sup>, Roeland E. Voorrips<sup>a</sup>, Awang Maharijaya<sup>a,i</sup>, Jos Molthoff<sup>a</sup>, Marcela Viquez Zamora<sup>a</sup>, Enny Sudarmonowati<sup>b</sup>, Ana Carolina Maisonnave Arisi<sup>c</sup>, Raoul J. Bino<sup>c</sup> and Arnaud G. Bovy<sup>a,d,\*</sup>

# Both authors contributed equally to this manuscript

<sup>a</sup> Wageningen UR Plant Breeding, 6708 PB Wageningen, The Netherlands

<sup>b</sup> Research Centre for Biotechnology, Indonesian Institute of Sciences, Jl. Raya Bogor KM. 46, Cibinong, Bogor 16910, Indonesia

<sup>c</sup> Present address: Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001, Florianópolis-SC, Brazil

<sup>d</sup> Plant Research International, 6700 AA Wageningen, The Netherlands

<sup>e</sup> Wageningen University, Laboratory of Plant Physiology, 6700 AR Wageningen, The Netherlands

<sup>f</sup> Netherlands Metabolomics Centre, Einsteinweg 55, 2333 CC, Leiden, The Netherlands,

<sup>g</sup> Present address: Bogor Agricultural University, Jl. Raya Darmaga, 16680 Bogor, Indonesia

<sup>h</sup> Present address: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC). Avenida Agustín Escardino 7, 46980 Paterna (Valencia), Spain

\*Corresponding author:

Arnaud G. Bovy

Wageningen UR Plant Breeding, 6708 PB Wageningen, The Netherlands

Tel: +31 (0)317-480762; Fax: +31 (0)317-418094

Email: arnaud.bovy@wur.nl

## Abstract

Untargeted LCMS profiling of semi-polar metabolites followed by metabolite quantitative trait locus (mQTL) analysis was performed in ripe pepper fruits of 113 F<sub>2</sub> plants derived from a cross between *Capsicum annuum* AC1979 (no. 19) and *Capsicum chinense* No. 4661 Selection (no. 18). The parental accessions were selected based on their variation in fruit morphological characteristics and fruit content of some target phytonutrients. Clear segregation of fruit colour and fruit metabolite profiles was observed in the F<sub>2</sub> population. The F<sub>2</sub> plants formed three clusters based on their metabolite profiles. Of the total of 542 metabolites, 52 could be annotated, including a range of flavonoids, such as flavone C-glycosides, flavonol O-glycosides and naringenin chalcone, as well as several phenylpropanoids, a capsaicin analogue, fatty acid derivatives and amino acid derivatives. Interval mapping revealed 279 mQTLs in total. Two mQTL hotspots were found on chromosome 9. These two chromosomal regions regulated the relative levels of 35 and 103 metabolites, respectively. Analysis also revealed an mQTL for a capsaicin analogue, located on chromosome 7. Confirmation of flavonoid mQTLs using a set of six flavonoid candidate genemarkers and their corresponding expression data (expression QTLs) indicated the Ca-MYB12 transcription factor gene on chromosome 1 and the gene encoding flavone synthase (FS-2) on chromosome 6 as likely causative genes determining the variation in naringenin chalcone and flavone C-glycosides, respectively, in this population. The combination of large-scale metabolite profiling and QTL analysis provided valuable insight into the genomic regions and genes important for the production of (secondary) metabolites in pepper fruit. This will impact breeding strategies aimed at optimising the content of specific metabolites in pepper fruit.

**Keywords:** *Capsicum*, F<sub>2</sub> population, semi-polar metabolites, mQTL, flavonoids, *MYB12*

**Electronic supplementary material:** The online version of this article (doi:10.1007/s11032-013-9967-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

**Acknowledgments** We thank Jeroen van Arkel, Thamara Hesselink, Henriëtte van Eekelen, Harry Jonker and Bert Schipper for their technical help and discussions, and Maarten Peters for excellent

greenhouse management. This work was supported by the Priority Programme of the Indonesia–Netherlands Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen (SPIN KNAW) INDOSOL (05-PP-21). We also acknowledge the Centre for Biosystems Genomics and the Netherlands Metabolomics Centre, which are part of the Netherlands Genomics Initiative/Netherlands Organization for Scientific Research, for funding.. In addition, we thank the cooperation program Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)-Wageningen UR Programme (project 005/09), Ministry of Education, Brazil, for the doctoral fellowship of VSH.



### 3.1 Introduction

Pepper (*Capsicum* spp.) is a member of the Solanaceae family, together with other important crops such as eggplant (*Solanum melongena*), tomato (*Solanum lycopersicum*) and potato (*Solanum tuberosum*). The genus *Capsicum* is categorized into 25 species and displays a wide range of genetic diversity. To introduce new traits into commercial hybrids, breeding programs based on interspecific crosses between cultivated and wild species, including *Capsicum annuum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum baccatum* L. and *Capsicum pubescens* Ruiz and Pav. are underway. Such crosses produce fertile and heterogeneous progenies (DJIAN-CAPORILANO et al., 2007) and give opportunities to introduce economically valuable traits from wild species into the cultivated varieties. One of such opportunities is the enrichment of pepper fruits with phytonutrients that encompass potential health-promoting properties.

Metabolite studies in pepper fruits have been mainly focused on the targeted analyses of specific groups of well-known pepper phytonutrients, including ascorbic acid (vitamin C), tocopherols (vitamin E), carotenoids (provitamin A), flavonoids and capsaicinoids (WAHYUNI et al., 2011; HOWARD; WILDMAN, 2007). Untargeted metabolite profiling techniques, such as those based on mass spectrometry (MS), allows the detection of metabolites in a biological sample, without *a priori* knowledge of the identity of the metabolites detected. Such profiling approach gives the opportunity to analyse hundreds of metabolites simultaneously and provides the necessary information to elucidate metabolic relationships at the biochemical level. For instance, untargeted profiling approaches have been used to obtain an overview of the metabolic diversity in germplasm collections of Arabidopsis (KEURENTJES et al., 2006), tomato (TIKUNOV et al., 2005) and pepper (WAHYUNI et al., 2012), and helped scientists to understand the genetic control of the metabolic pathways underlying the main biochemical contrasts between the genotypes under study. Metabolic pathways are generally controlled by multiple genes encoding specific biosynthetic enzymes as well as regulatory factors. The dramatic effect that both structural and transcription factor genes can have on the flux through a metabolic pathway has been demonstrated in, for example, transgenic tomatoes that produce high amounts of flavonols due to overexpression of the petunia *CHI* gene, which encodes the rate-limiting enzyme in the flavonoid pathway in tomato (MUIR et

al., 2001), or as the result of the introduction of transcription factor genes that up-regulate the endogenous flavonoid pathway genes in the fruit (BOVY et al., 2002; BUTELLI et al., 2008). The combination of metabolic and genetic analyses helps to identify genetic markers and key genes that underlie so-called metabolite QTLs (mQTLs), genomic regions which are associated with increased (or decreased) metabolite levels. Using targeted metabolite analyses approaches, the genetic regulation of specific metabolites, such as chlorophyll (BRAND et al., 2012) and the pungent capsaicinoids (BEN-CHAIM et al., 2006; BLUM et al., 2002; 2003), has been analysed in pepper fruit. Two major QTLs, *pc8.1* and *pc10.1*, that control chlorophyll content were identified in a population based on a cross between a dark green *C. annuum* and a light green *C. chinense* accession (BRAND et al., 2012). In addition, the QTL *pc8.1* also affected carotenoid content in ripe fruit in that population. In pungent peppers, the ability to produce capsaicinoids is determined by the presence of a functional *Pun1* gene on chromosome 2, which encodes the acyltransferase AT3 required for the formation of capsaicin from its aromatic precursor vanillylamine and various acyl moieties derived from the catabolism of branched-chain amino acids (MAZOUREK et al., 2009). A loss-of function allele of this gene, *pun1-1*, is present in all commercial non-pungent pepper varieties. Up to six QTLs affecting the capsaicinoid levels in pungent accessions have been identified on chromosomes 3, 4 and 7 (BEN-CHAIM et al., 2006; BLUM et al., 2003).

In order to find novel mQTLs in pepper fruit, we analysed a segregating F2 population derived from a cross between the wild pepper accession *C. annuum* AC1979 (no. 19) and the cultivated accession *C. chinense* No. 4661 selection (no. 18) for variation in semi-polar metabolites, using accurate mass LC-QTOF-MS. Subsequently we carried out an mQTL analysis using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) and microsatellite marker data available for this population (MAHARIJAYA et al., 2012b). The parental accessions were selected based on the results of a previous study with 32 pepper accessions (WAHYUNI et al., 2011; WAHYUNI et al., 2013) and differed for several metabolic traits: *C. annuum* AC1979 (no. 19) is highly pungent and has a high level of capsianosides (diterpene glycosides) and luteolin-*O*-glycosides (WAHYUNI et al., 2011), whereas *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18) showed high levels of the flavonoid naringenin chalcone (WAHYUNI et al., 2012). The two accessions also differed for their susceptibility to two thrips species, *Frankliniella occidentalis* and *Thrips parvispinus*: leaves of *C. annuum*

AC1979 (no. 19) showed a high thrips resistance, while *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18) was very susceptible (MAHARIJAYA et al., 2011; 2012a). This approach revealed valuable insight into the genomic regions important for the production of (secondary) metabolites in pepper fruit. Confirmation of the results using a candidate gene approach, in which flavonoid mQTL, gene expression (eQTL) and candidate gene marker data were combined, indicated several flavonoid genes as the causative gene underlying important flavonoid QTLs and provided valuable insight in the molecular regulation of the flavonoid pathway in pepper fruit. The impact of this approach on future breeding strategies aimed at developing new pepper varieties with a desired composition of specific metabolites will be discussed.

### **3.2 Materials and Methods**

#### **3.2.1 Plant materials**

An interspecific F2 population was derived from a cross between *C. annuum* AC1979 (no. 19) as the female and *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18) as the male (Supplemental Figure 3.1), previously described by Maharijaya et al. (2012b). In short, seeds of the two parental accessions were obtained from the Centre for Genetic Resources, the Netherlands (CGN). After crossing the two accessions, the F1 plants were grown in a controlled environmental greenhouse located in Wageningen (The Netherlands) from December 2007 until September 2008. Two F1 plants showing homogeneous phenotypes were chosen and were self-pollinated to obtain the F2 generation. The F2 population was subsequently cultivated from December 2008 until September 2009 and consisted of 201 plants: 81 plants from F1-1 and 120 plants from F1-2. These plants were randomly arranged in eight rows of 32 plants: including F2 plants, cuttings of F1 plants and the parental plants. Of the 201 F2 plants, only 113 plants produced enough fruits for further analysis and, depending on fruit size, 10-50 ripe fruits were harvested from each of these plants. Whole fruits were frozen in liquid nitrogen, ground and stored at -80 °C for further metabolite analysis.

### **3.2.2 Extraction and analysis of semi-polar metabolites**

Semi-polar metabolites were analysed from whole ripe fruits of 113 F2 plants, two F1 plants, and the parents *C. annuum* AC1979 (no. 19) and *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18). Metabolite extraction was performed according to de Vos et al. (2007). Briefly, ripe pepper fruits were frozen in liquid nitrogen and ground to a powder. Aliquots of 500 mg frozen powder were extracted with 1.5 ml of 99.875% methanol acidified with 0.125% formic acid. The extracts were sonicated, centrifuged and filtered through a 0.2 µm polytetrafluoroethylene (PTFE) filter. To check for total technical variations (i.e. extraction, sample analysis and data-processing), quality control samples were prepared by pooling fruit material that was extracted 10 times using the same procedure and injected after every 15 extracts.

All extracts were analysed using reversed phase liquid chromatography (Waters Alliance HPLC 2695) coupled to a photodiode array detector and a quadrupole time of flight high-resolution mass spectrometry (LC-PDA-QTOF-MS) system (Waters QTOF-Ultima), using C18-reversed phase chromatography (Phenomenex C-18 Luna column) and negative electrospray ionization, mainly as described previously (DE VOS et al., 2007). Extracts were diluted 10 times to prevent ionization saturation and 5 µl of the diluted extract was injected and separated using a binary gradient of ultrapure water (A) and acetonitrile (B), both acidified with 0.1% formic acid, with a flow rate of 0.19 ml/min. The initial solvent composition consisted of 95% of A and 5% of B; increased linearly to 35% A and 65% B in 45 min and maintained for 2 min. The column was washed with 25% A and 75% B for 5 min and equilibrated to 95% A and 5% B for 2 min before next injection.

### **3.2.3 Metabolite data processing**

Semi-polar metabolite data were processed as described below:

#### **3.2.3.1 Mass spectral alignment, filtering and clustering**

The dataset was processed using the MetAlign software package ([www.metalalign.nl](http://www.metalalign.nl)) for baseline correction, noise estimation, and ion-wise mass spectral alignment (LOMMEN; KOOLS, 2012). Absent values were replaced by the local noise. The MetAlign output was processed with MSClust for data reduction and extraction of compound mass spectra through clustering of individual ions originating

from the same metabolite (TIKUNOV et al., 2012). A total of 542 so-called reconstructed metabolites were thus obtained and used for mQTL analyses.

### 3.2.3.2 Putative identification of semi-polar metabolites

The identification of semi-polar metabolites was based on their UV spectra (if present), observed accurate mass (LC-QTOF-MS) and MS<sup>n</sup> fragmentation patterns (LTQ-Orbitrap FTMS), as described by Wahyuni et al. (2013). Putative identification of semi-polar metabolites was obtained using different metabolite databases such as Dictionary of Natural Products (<http://dnp.chemnetbase.com>) and KNApSAcK (<http://kanaya.naist.jp/KNApSAcK>) and based on comparison with an accurate mass in-house metabolite database developed from literature data (MARÍN et al., 2004) and previous metabolomics experiments in combination with accurate MS<sup>n</sup> fragmentation experiments (WAHYUNI et al. 2011; 2013).

### 3.2.3.3 Multivariate analysis

Semi-polar metabolite data sets containing the intensity levels of all centrotypes for all pepper samples were analysed separately using multivariate statistical analyses included at the Genemath XT version 1.6.1 software. Pre-treatment of the data was performed by log<sub>2</sub> transformation and mean centering. 542 metabolites were subjected to principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA). HCA was performed by using the UPGMA method and Pearson's coefficient matrix in Genemath XT software. To test the reliability of the dendrogram produced by HCA, bootstrap analysis was performed with 100 replications.

### ***3.2.4 Genetic linkage map construction and metabolic QTL mapping analysis***

A genetic linkage map was constructed with AFLP and microsatellite markers as described by Maharijaya et al. (2012b). In brief, 15 primer combinations were used to develop the following AFLP markers: P17-M39, P17-M32, P14-M50, P14-M49, P14-M48, P14-M41, P11-M61, P11-M48, E38-M49, E36-M48, E35-M58, E35-M49, E35-M48, E34-M48 and E32-M49. The sequence of these primers

followed the standard list for AFLP primer nomenclature (<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/keygeneAFLPs.html>). For microsatellite markers amplification, 56 simple sequence repeat (SSR) primers were used and the primer sequences were described in Maharijaya et al. (2012b). The microsatellite markers were used to assign linkage groups to known pepper markers (WU et al., 2009; YI et al., 2006; LEE et al., 2009). Based on all markers a linkage map was constructed using JoinMap 4.1 (VAN OOIJEN, 2006).

Metabolite QTL mapping analysis was performed using MapQTL 6.0 (VAN OOIJEN, 2009). Briefly, the data set containing the relative intensities of 542 metabolites were subjected to QTL analysis. To define the significance threshold of log of odds (LOD), 1000 permutation tests ( $P \leq 0.05$ ) were performed on several metabolites having low LOD score values for QTL detection. This led to a LOD threshold value of 3.7.

### **3.2.5 RNA extraction**

Total RNA was extracted from 50 mg freeze-ground pericarp of ripe fruits of 113 F2 segregating plants and the two parents *C. annuum* AC1979 (no.19) and *C. chinense* No. 4661 Selection (no.18) using RNeasy Plant Minikit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The quality and quantity of total RNA were measured by Nanodrop spectrophotometer ND1000 ISOGEN (Life Science) and evaluated by electrophoresis using 200 ng of the total RNA from each sample on 1.2 % w/v agarose gel. cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using Taqman® Reverse Transcription (Applied Biosystem) according to the manufacturer's instructions.

### **3.2.6 Selection and isolation of pepper flavonoid candidate genes**

Putative flavonoid candidate gene sequences were selected from the pepper gene index database (<http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=pepper>) based on homology with known flavonoid genes from tomato, i.e. *chalcone synthase (CHS)*, *chalcone isomerase (CHI)*, *flavanone 3-hydroxylase (F3H)*, *flavonol synthase (FLS)*, *flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H)*. In short, the tomato genes were compared with the pepper gene index using BLAST-N and the five best hits for each gene were re-

BLASTed against the tomato genome. Only those ESTs showing their best hit with a known tomato flavonoid gene were considered as a candidate for gene expression and/or marker analysis. In addition, a candidate *flavone synthase-2 (FS-2)* was selected based on homology with the *Lobelia erinus FS-2* gene. Furthermore, a *MYB12* transcription factor gene (coded as *Ca-MYB12* in this report) was isolated from pepper cDNA using the rapid amplification of cDNA ends (RACE)-PCR technique, using primer sets derived from the *SIMYB12* gene. For each candidate gene, a set of primers was designed using Primer3Plus (<http://probes.pw.usda.gov/cgi-bin/batchprimer3/batchprimer3.cgi>). Candidate genes and primer sequences are described in Supplemental Table 3.1.

### ***3.2.7 Flavonoid gene expression analysis***

Gene expression analysis was carried out by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) using iCycler iQ machine (Bio-Rad Laboratories) with iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) as fluorescent dye. The housekeeping gene,  *$\alpha$ -tubulin* was chosen to normalize the expression levels of candidate genes, due to the stability of its Ct (threshold cycle) value over all samples (results not shown). Expression levels of candidate genes were determined by the delta Ct ( $\Delta$ Ct) values, calculated by subtracting the Ct value of each candidate gene with the Ct value of  *$\alpha$ -tubulin*. For easy representation,  $2^{-\Delta$ Ct} was calculated, multiplied by 100 and converted to  $\log_2$ , as described by Livak and Schmittgen (2001).

### ***3.2.8 Detection of SNPs in flavonoid candidate genes and mapping of the genetic position of flavonoid SNP markers***

SNP detection was carried out by sequence analysis of PCR fragments of 14 flavonoid genes and one *R2R3-MYB12* transcription factor gene obtained from cDNA and/or genomic DNA of the two parents of the F2 population. Based on SNPs detected on sequences from both parents, a pair of specific primers was designed using Primer-Picker (KBioscience, UK) for each SNP (Supplemental Table 3.1) and genotyping of the F2 population was carried out using KASPar SNP Genotyping (KBioscience, UK). A subset of SNP profiles was integrated with AFLP and microsatellite markers to reconstruct the genetic map using JoinMap 4.1 (van Ooijen 2006).

### **3.2.9 Flavonoid QTL and flavonoid eQTL analyses**

Flavonoid QTLs obtained in previous analysis of this research were re-analyzed with the genetic map improved with flavonoid SNP markers using MapQTL 6.0 (VAN OOIJEN, 2009). Subsequently, flavonoid gene transcript QTL (eQTL) analysis was performed with the same genetic map and software as those used to re-analyzed flavonoid QTLs. The significance LOD (log of odds) thresholds was defined with permutation test (1000;  $P \leq 0.05$ ) on genes and several metabolites having low LOD score values for QTL detection, leading to a LOD threshold value for eQTL = 3.6 and mQTL = 3.7.

## **3.3 Results**

### **3.3.1 Phenotype of parental, F1 and F2 plants**

The two parental accessions that were used for generating the F2 population (Supplemental Figure 3.1), *C. annuum* AC1979 (no. 19) and *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18), varied in fruit colour, shape and size. Fruits of *C. annuum* AC 1979 (no. 19) were small (1.5 cm) and the colour of ripe stage fruits was red (Supplemental Figure 2a), while *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18) produced large (8.5 cm) brown ripe fruits (Supplemental Figure 3.2b). Ripe fruits of F1 plants were red (similar to the female parent *C. annuum* AC1979 (no. 19)), with a length of about 2.5 cm (Supplemental Figure 3.2c). The ripe fruit colour of the F2 plants segregated among individuals and ranged from dark red, red, brown to dark brown with a frequency of 20%, 56%, 13% and 11%, respectively (Supplemental Figure 3.2d). Also the fruit size segregated among F2 plants: the smallest fruit was 1 cm and the biggest reached up to 5 cm (Supplemental Figure 3.2d).

### **3.3.2 Semi-polar metabolites in ripe fruits of parental, F1 and F2 plants**

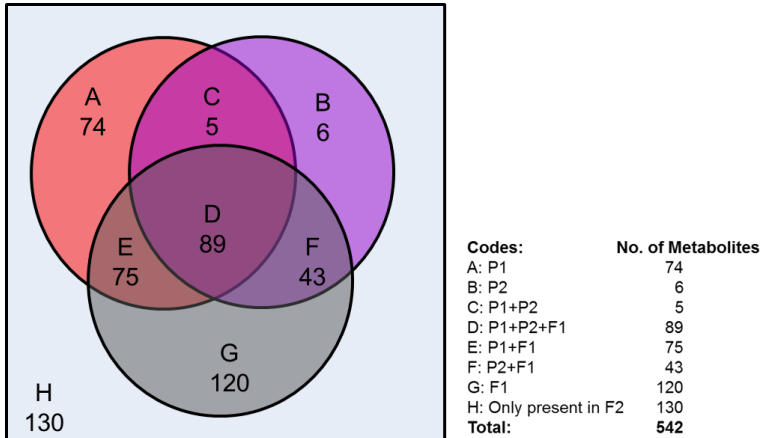
From previous work we observed that *C. annuum* AC1979 (no. 19) accumulated relatively high levels of capsianosides, capsaicinoids, chlorogenic acid and luteolin *O*-glycosides in its fruits, while *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18) fruits showed relatively high levels of naringenin chalcone and several specific flavonoid glycosides, such as a flavanone-tri-methyl-hexose-pentose and quercetin 3-*O*-rhamnoside-7-*O*-glucoside (WAHYUNI et al., 2011; 2013). Using



untargeted LC-PDA-QTOF-MS we determined the metabolite profiles of ripe fruits from parental, F1 and F2 plants. In total 542 semi-polar metabolites were detected over all samples, of which 74 metabolites (14%) were detected only in parent *C. annuum* AC1979 (no. 19) and six metabolites (1%) were detected only in *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18) (Fig. 3.1; circle A & B). Despite those differences, both parents also shared five metabolites (0.9%) which were not detected in the two F1 plants (Fig. 3.1; intersection C). The fruit metabolite profiles of the two F1 plants showed that these plants were identical and contained 120 metabolites (22%) that were below detection limits in either parent (Fig. 3.1; circle G). In addition, the contribution of each parent to the metabolite profiles of the F1 was shown by the presence of 75 metabolites (14%) derived from female parent no.19 (Fig. 3.1; intersection E) and 43 (8%) derived from male parent no. 18 (Fig. 3.1; intersection F). Another 89 metabolites (16%) were shared between all F1 plants and both parents (Fig. 3.1; intersection D). The other 130 metabolites (24%) were detected neither in parents nor in F1 plants, thus they were uniquely detected in fruits from F2 plants (Fig. 3.1; H).

Out of the 542 metabolites, 52 could be putatively identified based on comparison with an accurate mass in-house metabolite database developed from literature data (MARÍN et al., 2004) and from previous metabolomics experiments using the same LCMS system, in combination with accurate MS<sup>n</sup> fragmentation experiments (WAHYUNI et al. 2013; Supplemental Table 3.2). These metabolites belonged to a number of compound classes, such as flavonoids, phenylpropanoids, acyclic diterpenoids and fatty acid derivatives. Of all putatively identified metabolites, 43 accumulated at detectable levels in fruits of one or both parents and/or the F1 plants (Fig. 3.2), whereas 9 metabolites were uniquely found in F2 plants only. Acyclic diterpenoids with different sugar decorations, a capsaicin analogue, a lignan, fatty acid derivatives and amino acid derivatives, as well as the flavone luteolin 7-*O*-(2-*O*-apiosyl)-glucoside were found in the female parent and F1 plants. In addition, we detected naringenin chalcone, quercetin 3-*O*-rhamnoside-7-*O*-glucoside, luteolin *C*-glycosides and some yet unknown metabolites in the male parent and F1 plants. Flavonoids, including apigenin, luteolin and quercetin glycosides were relatively abundant in F1 plants compared to the parents.

**Figure 3.1** Venn diagram of 542 semi-polar metabolites detected in ripe fruits of two parental accessions: P1=*C. annuum* AC1979 (no. 19) and P2=*C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18), F1 and F2 plants. Values in circles and intersections illustrated the number of metabolites accumulating in each of the sample groups. A metabolite was denoted as “detected” in a given sample when the mass intensity level of its centroid mass peak was above the local noise. According to the Metalign output the local noise was set at a mass intensity of 37.

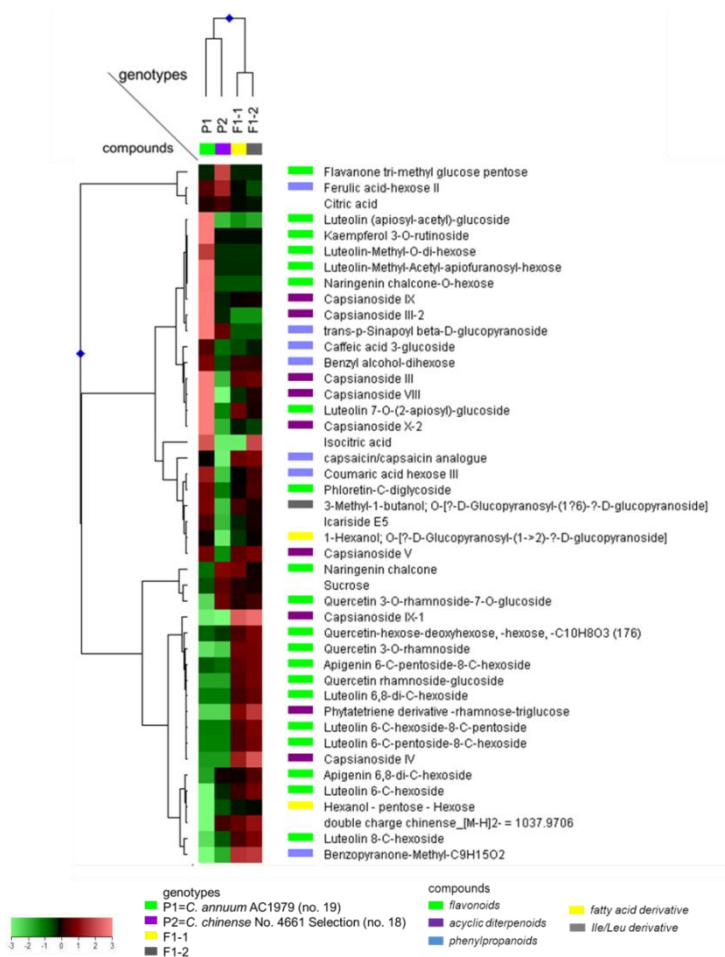


The semi-polar metabolite profiles in ripe fruits of all F2 plants were subjected to principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA). Based on the variation in semi-polar metabolite profiles, PCA revealed a separation of the samples into three main clusters: Cluster I contained eight F2 plants, Cluster II consisted of 11 F2 plants plus the accession *C. annuum* AC1979 (no. 19) and Cluster III contained 92 F2 plants together with the F1 plants (Fig. 3.3a). Three F2 plants and the male parent *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18) were not denoted to a specific cluster and they showed an intermediate behaviour. The first principal component (PC1) explained 32.5% of the variation and separated Cluster I and Cluster II from Cluster III. The second principal component (PC2) explained 11.2% of the variation and separated Cluster I from Cluster II.

HCA of the set of 542 semi-polar metabolites revealed the presence of specific metabolite groups, arbitrarily denoted A to F, as characterized by their specific accumulation pattern across the genotypes (Fig. 3.3b). Structurally related metabolites derived from the

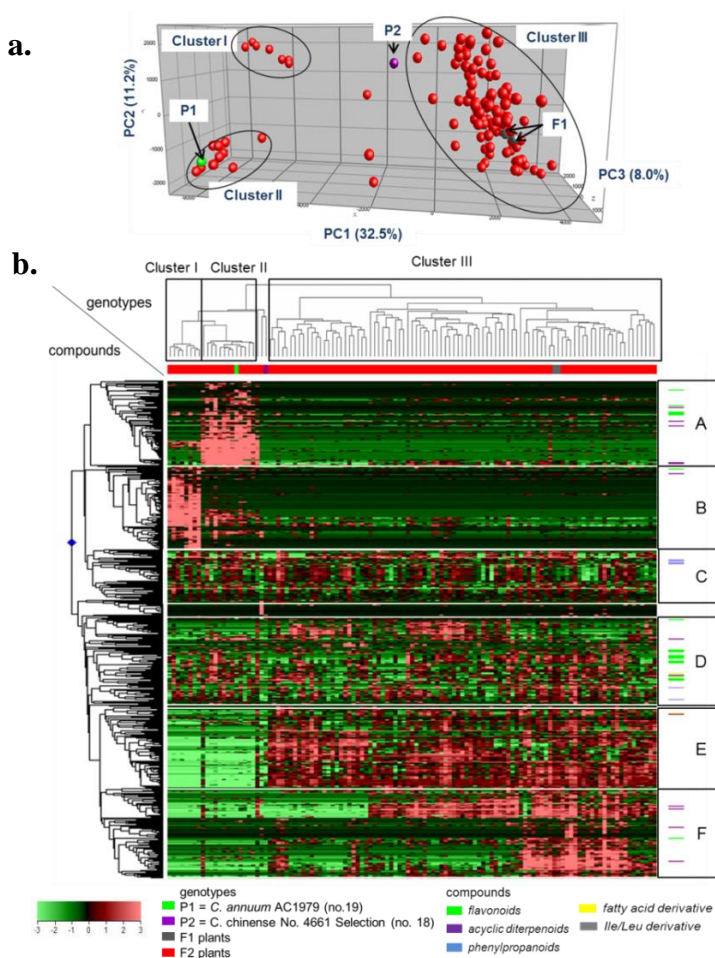
same metabolic pathway may cluster together, as shown previously for volatiles in tomato (TIKUNOV et al., 2005) and pepper (EGGINK et al., 2012; WAHYUNI et al., 2013).

**Figure 3.2** Heat map of 43 putative semi-polar metabolites which accumulated in ripe fruits of the parental accessions: *C. annuum* AC1979 (no. 19) and *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18), and/or the two F1 plants. A color-coded matrix represents values of the metabolite intensity in each genotype, which has been log<sub>2</sub> transformed and mean-centered.



The heat map of the 542 metabolites shows a group of 98 metabolites in group D, which contained all flavone *C*-glycosides next to flavonol *O*-glycosides, naringenin chalcone and its glycoside derivative, phenylpropanoids, a capsaicin analogue, fatty acid derivatives and amino acid derivatives (Fig. 3.3b; Supplemental Table 3.2). The metabolites in this group and all metabolites in group C were present at different relative abundance in all plants tested and their segregation pattern in the F2 plants was not specific for any of the three genotype clusters, since genotypes with high and low abundance of these metabolites were present in each cluster. Metabolites in group B accumulated at relatively high abundance in the ripe fruits from the F2 plants of Cluster I only. Three out of the 90 metabolites of group B were putatively identified as capsicosides, a group of steroidal glycosides detected previously in *C. annuum* var. *acuminatum* seeds (YAHARA et al., 1994; IORIZZI et al., 2002). These compounds were reported to have antimicrobial activity against yeast and fungi (Iorizzi et al. 2002). All 94 metabolites in group A accumulated at relatively high levels in Cluster II which contained several F2 plants and the female parent (no. 19). Group A contained five capsianosides and six flavonoid *O*-glycosides, including several luteolin *O*-glycosides as well as quercetin- and kaempferol *O*-glycosides. These compounds were previously shown to accumulate at relatively high levels in female parent no. 19 (WAHYUNI et al., 2013) and in the F1 plants (Fig. 3.3b; Supplemental Table 3.2), in comparison to parent no. 18. The 187 metabolites in groups E and F were detected at low levels in genotype Clusters I and II and contributed to the characteristic metabolite pattern of genotype Cluster III. Metabolites of group E accumulated at relatively high levels in all plants of genotype Cluster III and contained several unique, but yet unknown metabolites, detected as doubly charged negative ions, as well as one capsianoside and one capsoside (Fig. 3.3b; Supplemental Table 3.2). Capsoside is a cell wall galactolipid that has been previously detected in very small amounts in ripe fruits of *C. annuum* var. *acuminatum* (IORIZZI et al., 2001). Other capsianosides with different glycoside decorations were present in group D, E and F. In addition, one specific flavonol glycoside, present in group F, was detected at relatively high abundance in several F2 plants of Cluster III.

**Figure 3.3** Principal component and hierarchical cluster analysis of F2 plants, two F1 plants and two parental accessions. **a**, Principal component analysis. P1=*C. annuum* AC1979 (no. 19) and P2=*C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18), based on 542 semi-polar metabolite profiles in ripe fruits. **b**, Hierarchical cluster analysis. Heat map of 542 metabolites in ripe fruits of F2, two F1 and two parental accession plants, *C. annuum* AC1979 (no. 19) and *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18). A color-coded matrix represents the value of the metabolite intensity in pepper samples, which has been log<sub>2</sub> transformed and mean-centered. The alphabets (A-F) represent metabolite clusters. Characteristics of the underlying metabolites are presented in Supplemental Table 2.

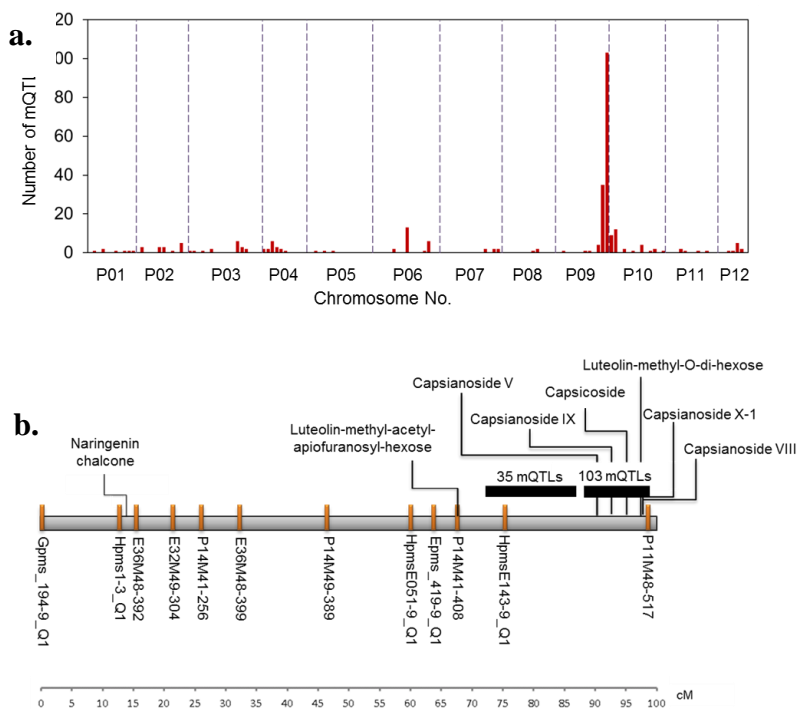


### 3.3.3 QTL analyses of the F2 population

To uncover genetic loci controlling the observed variation in metabolic profiles, we subsequently analysed the genetic distribution of the 542 metabolite patterns using QTL analysis. We could significantly link 231 metabolites to one or more genetic markers (based on interval mapping with a LOD threshold of 3.7), accounting for a total of 279 mQTLs. In total 24 out of these 231 metabolites were putatively annotated as belonging to several metabolite classes, including acyclic diterpenoids/capsianosides, phenylpropanoids, fatty acid derivatives, amino acid derivatives and flavonoids (Supplemental Table 3.4). In addition, we found several mQTLs for yet unknown, doubly charged compounds (Supplemental Table 3.4). The 279 mQTLs were not evenly distributed over the genome and in particular two major QTL hotspots were detected on chromosome 9 (Fig. 4a): one mQTL hotspot harbouring 35 mQTLs co-localized with the marker HpmsE143-9\_Q1 at 76 cM and a second hotspot harbouring 103 mQTLs co-localized with the marker P11M48-517 at 100 cM (Fig. 3.4b). The first group included several doubly charged compounds, which were detected at significant levels in both the male parent (no. 18) and the F1 plants (Supplemental Table 3.2). The mQTL hotspot adjacent to marker P11M48-517 included seven putatively annotated metabolites, of which five were putatively identified as capsianosides. The QTL for these capsianosides was derived from the female parent (no. 19), as demonstrated by the positive effect of the homozygous A allele on their accumulation (Supplemental Table 3.4) and their relative abundance in the female parent (Fig. 3.2). In addition, we revealed 11 mQTLs for flavonoid glycosides distributed over several genomic locations (Supplemental Table 3.4). QTLs for quercetin, luteolin and apigenin glycosides were located at different positions on different chromosomes, i.e. we found a QTL for quercetin rhamnoside-glucoside on chromosome 2 at 144 cM and a QTL for quercetin 3-*O*-rhamnoside on chromosome 10 at 7 cM (linkage group 10b). On chromosome 6, several QTL's for flavone C-glycosides, including two apigenin C-glycosides and two luteolin C-glycosides, were found in the region from 160 to 167 cM. In addition, QTLs for two methylated luteolin glycosides were found on chromosome 9 at 68 and 97 cM, in the QTL hotspot region. On the top of chromosome 9 we also found a QTL for naringenin chalcone (Fig. 3.4b). Furthermore, two QTLs for flavanone-3 methyl glucose pentose were found on chromosome 6 and 7, respectively. QTLs for other phenylpropanoids and acyclic diterpenoids were observed at different

linkage groups (Supplemental Table 3.4). The capsaicin analogue, which has been shown previously to be highly correlated with total capsaicinoid levels (WAHYUNI et al., 2011) was linked to a QTL on chromosome 7 (98 cM).

**Figure 3.4** Overview of mQTLs in pepper fruit. **a**, Frequency distribution of total mQTLs detected at each marker position on pepper chromosomes, which is represented by red bars. The dotted vertical lines represent the chromosomal borders. **b**, mQTLs likelihood map on chromosome 9.



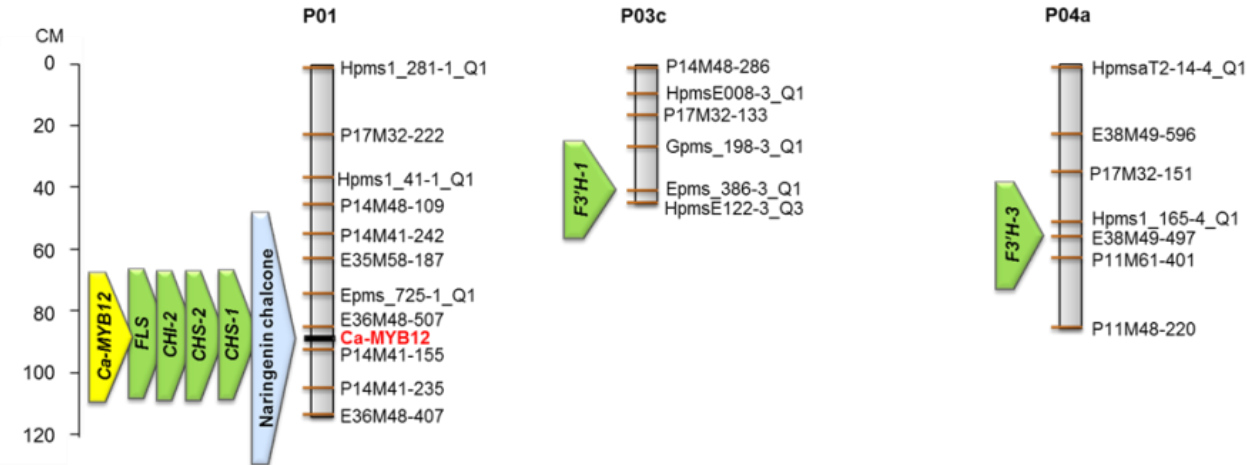
To validate the flavonoid QTLs detected using the untargeted metabolomics approach and to get insight in the underlying molecular regulation, three experiments were conducted: (i) mapping the genetic position of flavonoid candidate genes, (ii) re-analysis of the flavonoid mQTLs using the flavonoid candidate genes as markers and (iii) expression QTL (eQTL) analysis using flavonoid gene expression data.

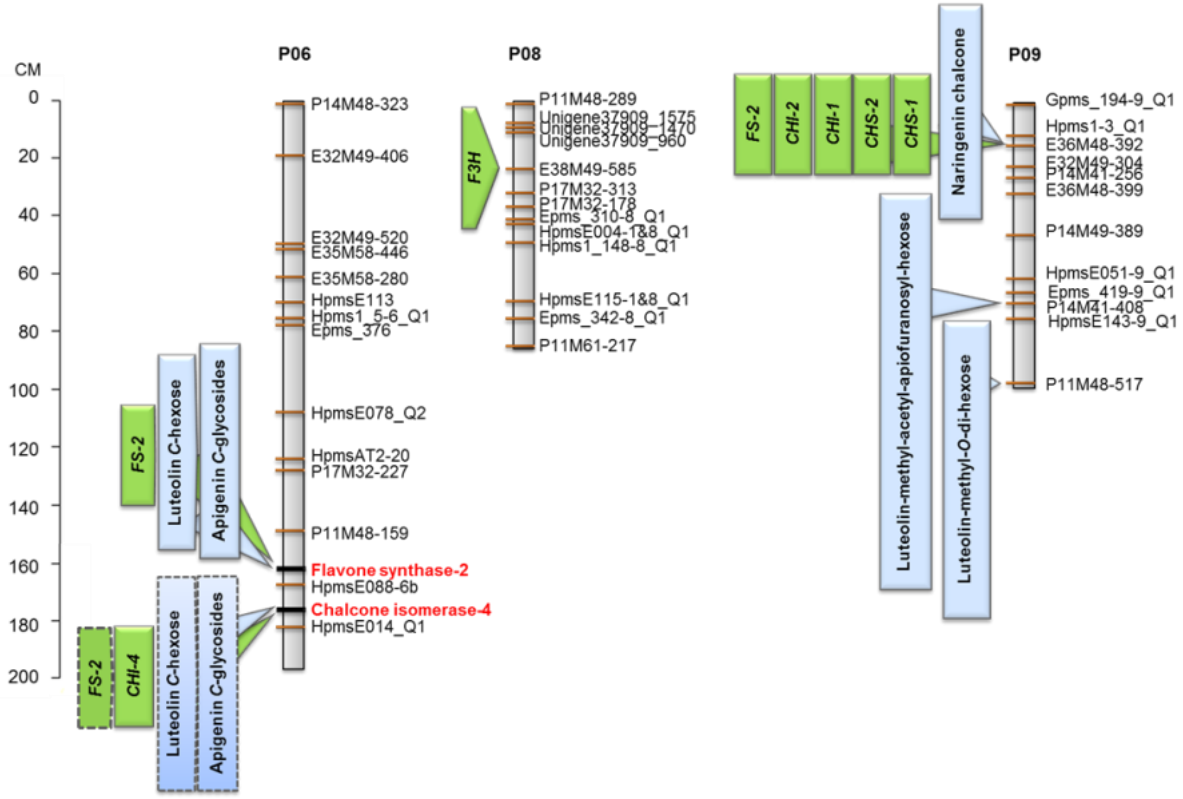
Firstly, a *Ca-MYB12* transcription factor gene, three *chalcone synthase* (*CHS-A*, *CHS-1* and *CHS-2*), four *chalcone isomerase* (*CHI-1*, *CHI-2*, *CHI-3* and *CHI-4*), a *flavanone-3-hydroxylase* (*F3H*), a *flavonol synthase* (*FLS*) and three *flavanone-3'-hydroxylase* (*F3'H-1*, *F3'H-2* and *F3'H-3*) candidate genes were identified based on homology with known tomato flavonoid genes. In addition, a *flavone synthase* candidate gene (*FS-2*) was identified based on homology with the *Lobelia erinus* *flavone synthase* (*FS-2*) gene. For ten genes (*Ca-MYB12*, *CHS-2*, *CHI-1*, *CHI-2*, *CHI-4*, *F3H*, *F3'H-1*, *F3'H-3*, *FLS* and *FS-2*), SNPs between the two population parents were obtained and used to genotype the segregating F2 population. These data were used to locate the position of the candidate genes on the pepper genetic map. Out of these ten candidate genes, five genes could be located on chromosome regions, i.e. *Ca-MYB12* at 89.6 cM on chromosome 1, *CHS-2* on the top (0.0 cM) of chromosome 5 (linkage group 5a), *CHI-2* at 15.4 cM on chromosome 5 (linkage group 5a), *FS-2* at 162.1 cM on chromosome 6 and *CHI-4* at 176.8 cM on chromosome 6 (Fig. 3.5; Supplemental Table 3.3). *FLS* could not be linked to this genetic map. Secondly, all detected flavonoids were re-analysed for mQTLs using the updated genetic map including the flavonoid candidate genes markers. Several flavonoids showed their strongest linkage (based on LOD score) to one or more of the flavonoid candidate gene markers (Fig. 3.5; Supplemental Table 3.5). For example, in addition to the one on chromosome 9, we identified a second naringenin chalcone mQTL linked to the *Ca-MYB12* marker on chromosome 1 (LOD score = 4.1). Together, these two mQTL's explain 37 % of the variation in naringenin chalcone. A strong mQTL for flavone-C-glycosides was found on chromosome 6, having its strongest association with the *FS-2* gene (162 cM; LOD = 15.3), which encodes the last step in the biosynthesis of flavones. This QTL explains up to 40 % of the variation in flavone-C-glycosides. A significant association of flavone-C-glycosides was also found with the nearby *CHI-4* (176.8 cM; LOD = 7.7) marker. We are not sure, however, whether *CHI-4* represents a separate mQTL, since this locus is overlapping with the *FS-2* QTL interval. Thirdly, we analysed the expression of the candidate genes in ripe fruits of the F2 individuals and subjected them to an eQTL analysis. For eleven genes (*Ca-MYB12*, *CHS-1*, *CHS-2*, *CHI-1*, *CHI-2*, *CHI-4*, *F3H*, *F3'H-1*, *F3'H-3*, *FLS* and *FS-2*) significant expression levels could be observed and these could be used for eQTL analysis, while three candidate genes (*CHS-A*, *CHI-3*, and *F3'H-2*) were not expressed in pepper fruit. Strong eQTLs were found for *CHS-1*, *CHS-2*, *CHI-2*, *FLS* and *Ca-MYB12*, overlapping with



the position of the naringenin chalcone mQTL at the *Ca-MYB12* marker on chromosome 1 (Fig. 3.5). eQTLs for *CHS-1*, *CHS-2*, *CHI-1*, *CHI-2* and *FS-2* also co-localised with the naringenin chalcone mQTL on the top of chromosome 9. In addition to the flavone-*C*-glycosides, the *FS-2* marker on chromosome 6 was associated with an eQTL of the corresponding *FS-2* gene. Similarly, a *CHI-4* eQTL showed the strongest association with the SNP marker in the *CHI-4* gene. Additional eQTLs were found for *F3'H-1* on chromosome 3, *F3'H-4* on chromosome 4 and *F3H* on chromosome 8. None of these eQTL's co-localised with a flavonoid mQTL, neither did they have an association with any of the flavonoid genes mapped in this study. It should, however, be noted that these three genes were not among the set of mapped flavonoid genes.

**Figure 3.5** Flavonoid mQTLs and flavonoid candidate gene eQTLs on pepper chromosomes. Light blue boxes indicate flavonoid mQTLs, the yellow box indicates the *Ca-MYB12* transcription factor eQTL and green boxes indicate eQTLs of flavonoid structural candidate genes. Boxes with grey dotted outlines indicate flavone C-glycoside mQTLs and an *FS-2* eQTL with significant LOD scores (mQTL = >3.7; eQTL = >3.6) at the *CHI-4* locus, but these are not considered as a separate locus for those metabolites, since they are overlapping with the *FS-2* QTL interval. Abbreviations: CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavanone-3-hydroxylase; FLS, flavonol synthase; F3'H, flavonoid-3'-hydroxylase; FS, flavone synthase.





### 3.4 Discussion

The cross between *C. annuum* AC1979 (no. 19) and *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18) generated a varied F2 population that genetically segregated for fruit colour as well as for the composition and level of metabolites in ripe fruits. The red fruit colour of the female parent *C. annuum* AC 1979 (no. 19) is regulated by the dominant *Y* locus, encoding capsanthin-capsorubin synthase (CCS) which catalyses the production of the red carotenoids capsanthin and capsorubin from antheraxanthin and violaxanthin, respectively (LEFEBVRE et al., 1998; PARAN; VAN DER KNAAP, 2007). The male parent, *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18), is brown-fruited, caused by the coincident accumulation of both red carotenoids and green chlorophyll B. Brown-fruited pepper contain a single recessive *cl* (*chlorophyll retainer*) locus combined with the dominant *Y* locus (EFRATI et al., 2005; ROCA et al., 2006) and the crossing of both parents ( $y^+cl^+ \times y^+cl$ ) resulted in a red fruited F1 ( $y^+y^+cl^+cl$ ). The F2 fruit colour segregated into the expected 3:1 (red:brown) ratio, due to segregation of the *cl* gene.

The crossing of the parents with different metabolite profiles revealed the segregation of metabolites detected in either or both parents over the F2 plants, as we observed for the metabolites in groups A, C, and D (Fig. 3.3b). Based on metabolite profile, the F1 hybrid was most similar to the male parent *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18), since they clustered together into genotype cluster III in both the PCA (Fig. 3.3a) as well as the HCA (Fig. 3.3b). This cluster also contained the majority of F2 plants, indicating that the biochemical profile of the male parent (no. 18) was dominant over the female parent (no. 19) in both the F1 and the F2. This may suggest that the male parent (no. 18) contains many dominant alleles for metabolite production. However, we cannot exclude that several mQTLs from the female parent may be linked to lethal traits coming from the wild female parent, which may lead to lethality, or reduced flower and fruit set and thus to a skewed segregation. This is supported by the fact that from 201 F2 plants, only 113 set fruit and hence could be used in this study. In addition, a skewed segregation for several markers has indeed been observed by genetic analysis of the F2 population (MAHARIJAYA et al., 2012b). Ripe fruits from both the F1 hybrid as well as several F2 plants contained metabolites that were not detected in any of the parents (metabolite clusters B, E and F). These metabolites are likely the result of epistatic effects of alleles from both parents. In addition to such epistatic effects, we found several metabolites that were significantly (up to 12-fold)

more abundant in some F2 plants compared to both parents and the F1 hybrid (particularly flavonoid glycosides in metabolite group D, such as flavone *C*-glycosides, flavonol *O*-glycosides and naringenin chalcone). This may be caused by a combination of positive alleles derived from both parents, a phenomenon called transgressive segregation. Alternatively, such extreme phenotypes may also reflect environmental variation or an interaction between genotype and environment. Replicated trials would be needed to distinguish between these different possibilities. Using the segregation in metabolite profiles we could define various mQTLs from the correlation between the genetic and metabolic data sets. At least 231 (43%) of the 542 metabolites could be linked to one or more genetic markers. The mQTLs were unevenly distributed over the pepper genome, as we could identify mQTL hotspots on chromosome 9 showing an association with up to 103 metabolites. This suggests that large groups of metabolites share a common genetic region, encoding one or more genes that regulate the accumulation of those metabolites. For example, on the QTL hotspot at 75 cM on chromosome 9 we found co-localization of 16 yet unknown metabolites which all showed a typical doubly charged ionization behaviour in our LCMS set up, suggesting the presence of a regulatory gene driving the synthesis of these compounds or a structural gene at an early step in the biosynthetic pathway leading to these double charged compounds.

The mQTL hotspot on the bottom of chromosome 9 (99 cM) was linked to four acyclic diterpenoids, also called capsianosides (Supplemental Table 3.4). Accurate mass MS and MS<sup>n</sup> fragmentation information revealed that these capsianosides contained different decorations of the basic diterpene skeleton (Supplemental Table 3.2). For example, capsianoside VIII has a diglucoside conjugated to the C-3 position of the capsianoside aglycone, whereas capsianoside IX has a triglucoside at this position (LEE et al., 2006; Supplemental Figure 3.3). These five capsianosides accumulated in genotypes homozygous for the maternal allele (parent no. 19 and F2 plants) of the corresponding marker, suggesting that this allele may encode a regulatory gene which up-regulates the capsianoside biosynthetic pathway. Alternatively, it is possible that this QTL region encodes one or more modifying enzymes, such as glycosyltransferases, which lead to the production of these structurally different capsianosides.

Both parents used in this study were pungent, but showed quantitative differences in capsaicin content (WAHYUNI et al., 2011). In this study we mapped a QTL for the capsaicin analogue, which was

shown to be highly correlated with total capsaicin content (WAHYUNI et al., 2013), on chromosome 7. In pepper, QTLs that control the capsaicinoid content in ripe fruits have been reported in a F3 population derived from an interspecific cross between the mildly pungent *C. annuum* cv. ‘NuMex RNaky’ and the highly pungent *C. frutescens* accession BG2814-6 (BEN-CHAIM et al. 2006). Two capsaicinoid QTLs in this F3 population were located on chromosome 2 and 7. The QTL on chromosome 2 encodes *AT3* (acyltransferase), the structural gene encoding the enzyme responsible for capsaicinoid condensation (BLUM et al., 2002; MAZOUREK et al., 2009). Candidate genes have also been proposed for the QTL on chromosome 7, for example the putative aminotransferase gene *pAMT*, which may encode the enzyme catalyzing the formation of vanillylamine from vanillin (MAZOUREK et al., 2009). The co-localisation of a QTL for capsaicin content on chromosome 7 in both populations may point to the same underlying candidate gene. This will be examined in a follow-up study.

Several flavonoid mQTLs were detected in this F2 population (Supplemental Table 3.4). To get more insight into the genes and molecular mechanisms underlying these QTLs, we (i) mapped the position of five flavonoid candidate genes and integrated these data into an updated genetic map, (ii) performed an eQTL analysis based on gene expression data of 14 flavonoid genes and (iii) re-analysed the flavonoid mQTL data using the updated genetic map (Fig. 3.5; Supplemental Table 3.5). This allowed the detection of a new QTL for naringenin chalcone on chromosome 1, with its QTL maximum at the *Ca-MYB12* gene. Expression QTLs for *Ca-MYB12*, *CHS-1*, *CHS-2*, *CHI-2* and *FLS* mapped at the same position. This is fully in line with results observed in tomato, where the *MYB12* gene has been shown to regulate the level of naringenin chalcone in the peel of ripening tomato fruits, through induction of the same set of flavonoid structural genes (BALLESTER et al., 2010; ADATO et al., 2010). Although the mQTL for naringenin chalcone on chromosome 9 was confirmed, none of the candidate genes tested mapped within this QTL interval. However, significant eQTLs for *CHS-1*, *CHS-2*, *CHI-1*, *CHI-2* and *FS-2* mapped at the same position, suggesting that this naringenin chalcone mQTL is also driven by the action of a, yet unknown, transcription factor gene, in analogy to the *MYB12* QTL on chromosome 1. On chromosome 6, the mQTLs for four flavone-*C*-glycosides and the eQTL for flavone synthase (*FS-2*) showed their strongest association with the corresponding *FS-2* marker at 162.1 cM, explaining up to 40% of the variation in these compounds. This suggests that *FS-2*, which catalyses the conversion of flavanones into

flavones, is the gene regulating flavone-*C*-glycoside levels in this material, through differences in its expression. Our current efforts are geared towards the elucidation of the causative mutations in the *FS-2* gene or its promoter leading to the observed gene expression differences.

In addition to these four flavone-*C*-glycosides, three additional flavone-*C*-glycosides were detected in metabolite group D of the HCA (Fig. 3.3b). These seven flavone-*C*-glycosides were highly correlated to each other ( $R^2 > 0.6$ ; Supplemental Table 3.6). Although only four of these seven flavone-glycosides were significant in interval mapping, both the HCA and correlation analysis suggest that the *FS-2* locus regulates the formation of all flavone-*C*-glycosides, as would be expected based on the function of the *FS-2* enzyme. The lack of significance of the additional three flavone *C*-glycosides in interval mapping might be due to the limited population size, the presence of additional, undiscovered QTLs and/or environmental variation influencing the efficiency of QTL detection.

The *CHI-4* locus at 176.8 cM on chromosome 6 showed an eQTL for the corresponding *CHI-4* gene. In addition this locus revealed significant associations with the flavone-*C*-glycosides and *FS-2* gene expression. We can not distinguish whether *CHI-4* represents a separate locus for flavone *C*-glycosides, since it is overlapping with the *FS-2* QTL interval. However, the fact that the direction of the *CHI-4* eQTL is opposite to that of the *FS-2* and flavone *C*-glycoside QTLs argues against a second QTL for flavone-*C*-glycosides (Supplemental Table 3.5). For several other flavonoid metabolite and expression QTLs, we did not observe a link to any of the flavonoid genes tested. This is mainly due to the limited number of flavonoid genes mapped in this study. Our results, however, demonstrate the power of a candidate gene approach to find the genes underlying important mQTLs, in case of a well-studied metabolic pathway. We are convinced that genetic mapping of additional flavonoid candidate genes would uncover the genes underlying several additional flavonoid QTLs in this population.

All QTL results have been obtained from the analysis of a segregating F2 population. In such a population, all F2 individuals are unique and mortal. Despite the lack of biological replicates in such a population, reliable QTLs can be found, due to the fact that every genomic region is represented, and therefore replicated, in 75% of the F2 individuals. Although reliable, the size of the QTL intervals in an F2 population is rather large, since only few meioses, and hence recombinations, have taken place during its development. On the other

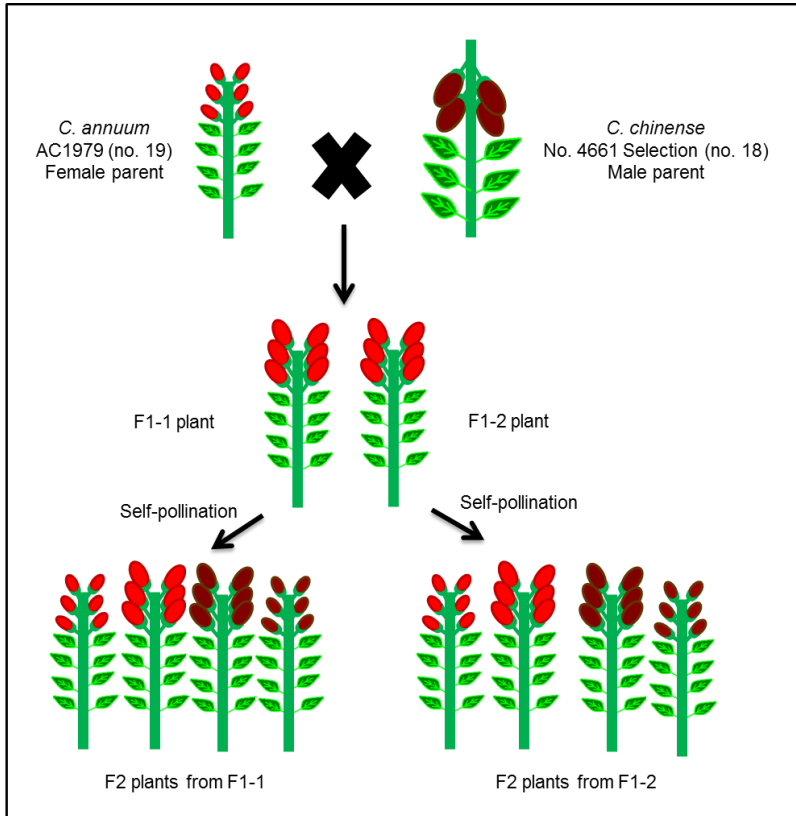
hand, the relatively high level of heterozygosity present in an F2 population makes it possible to estimate the degree of dominance for detected QTLs (SEMAGN; BJØRNSTAD; XU, 2010). Currently we are developing a Recombinant Inbred Line (RIL; > F6 generation) population based on the same cross between *C. annuum* AC1979 (no. 19) and *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18). Individuals of such a population are homozygous for more than 97%, can be propagated indefinitely through seeds and form a stable resource for future research. This material will be used to further confirm and test the robustness of selected QTLs, using biological replicates in different environmental conditions.

In summary, our results suggest that the extensive biochemical variation in pepper fruit is under the genetic control of a limited number of chromosomal regions (QTL hotspots), encoding genes that regulate the accumulation of large sets of metabolites. The coming years we expect the release of the complete sequencing of the pepper genome (PARK et al., 2012) and this will aid strongly to the identification of the key genes underlying important agronomic traits. Combining genetic and biochemical data sets will help breeders to develop new pepper varieties that unite a desirable taste and nutritional profile with genetic resistance to important diseases.

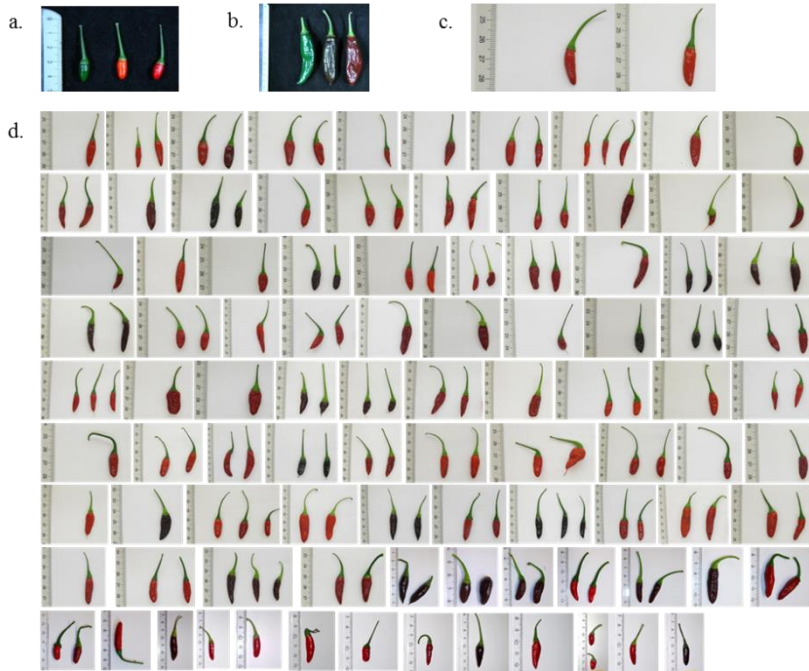


### 3.5 Supplementary Materials

**Supplemental Figure 3.1** A crossing scheme to develop F2 plants from *C. annuum* AC1979 (no. 19) and *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18). Two homogenous F1 plants were obtained by crossing two pepper accessions. Each of F1-plants was self-pollinated to produce F2 progeny. The representation of plants shown in the scheme is not in true scaled.



**Supplemental Figure 3.2** Variation in fruit morphological characters of: a, *C. annuum* AC1979 (no. 19); b, *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18); c, F1 plants; and d, F2 plants

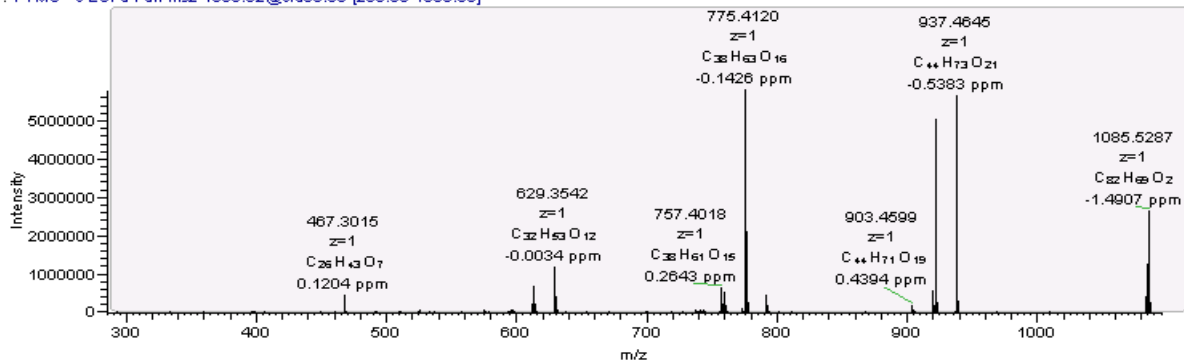


**Supplemental Figure 3.3** MS<sup>n</sup> fragmentation pattern of Capsianoside VIII and IX using LTQ-Orbitrap FTMS in negative ionization mode.

Capsianoside VIII

F010024#1333 RT: 26.93 AV: 1 NL: 5.79E6

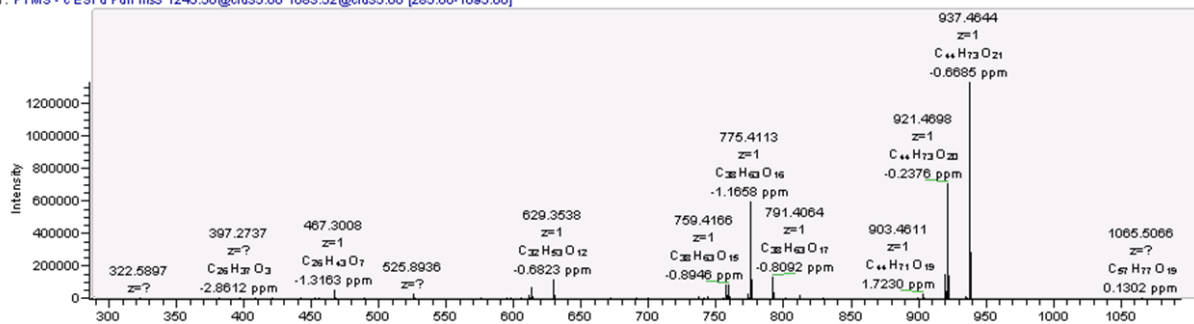
T: FTMS - e ESI d Full ms2 1083.52@cid35.00 [285.00-1095.00]



## Capsianoside IX

F010024 #1221 RT: 24.55 AV: 1 NL: 1.34E6

T: FTMS - e ESI d Full ms3 1245.56@cid35.00 1083.52@cid35.00 [285.00-1095.00]



**Supplemental Tables 3.1** Flavonoid candidate genes (A) and primers for SNPs (B)

**A. Flavonoid Candidate Genes**

<b>Gene Name</b>	<b>Gene Code</b>	<b>Candidate Gene from DFCI Pepper Gene Index</b>	<b>Primer Sequence</b>
$\alpha$ -Tubulin	<i>Tub</i>	145388967	F TGAAGCACGTGAAGATCT R GTCCAATTCAGCACCAACCT
CaMYB12	<i>Ca-MYB12</i>		F CAGATGATGGTAGACTTGAATG R CTAGGAATTGATGATGACCCTA
Chalcone synthase	<i>CHS-1</i>	TC19590	F AGTGGTGAAGGGCTTGAATG R CAGCCAGCCCACTTAAATA
	<i>CHS-2</i>	TC13169	F AAGGCCTTTGTTTGAGCTTG R GACCATCTATAGCGCCTTCG
Chalcone isomerase	<i>CHI-1</i>	TC13824	F CCCTTGACGGGTAAGCAATA R TTTCGATGGCCTCACTCTCT
	<i>CHI-2</i>	TC25522	F GATGGGCCATGGAATAACTG R TCCATTGCTGCAAATGAGTC
	<i>CHI-3</i>	TC14193	F TGCCATCAAGAAGCTCACTG R CATATCCTGGGAGCCTTGAA
	<i>CHI-4</i>	TC22835	F GGTGTTTATGCTGACGATGC R ACAGAGTGCTGTGCATGCTT
Flavanone 3-hydroxylase	<i>F3H</i>	CO912387	F ATCAGAAGCAATGGGTTTGG R ATCAGGCTGTGGACACTTTG
Flavone synthase	<i>FS-2</i>	KS19022A05	F AGAACCCAATGGAGTTTAGGC R AAATATTGGGCCTCCCTCTC
Flavonol synthase	<i>FLS</i>	TC24608	F CCCATCAGAGCATGAAGTTG R TGGGTTGATTGGCCTCAT

<b>Gene Name</b>	<b>Gene Code</b>	<b>Candidate Gene from DFCI Pepper Gene Index</b>	<b>Primer Sequence</b>
Flavonoid 3'-hydroxylase	<i>F3'H-1</i>	GD063322	F AAGCCCAGTTAAACGAATGG R GGGTATACGCATGGTCCAGT
	<i>F3'H-2</i>	TC13232	F GCAGGAGATATGAAGCCAGAA R ATCGGCTTATTTGGGTGTGT
	<i>F3'H-3</i>	TC19978	F TTCTCGTCCTGCATTAGCTG R TAAGGTGCCACGTCATGT

**B. SNPs profile on flavonoid candidate genes**

<b>Gene Name</b>	<b>Gene Code</b>	<b>Sequence</b>
Chalcone synthase	CHS-2	GGGGCAGCCGCACTCATTGTAGGTTCCAGATCCATTACCAGAGGTTGAAAG[G/A]CCTT TGTTTGAGCTTGTTTCTGCGGCCAAACTCTTCCCTGATAGCGA
	CHI-1	CAACTGTCAGAAGCGGTGCTGGAATCCATAATTGGCAAGCACGGAGTTTC[A/C]CCTG CCGCAAAGAATAGTCTTGCCAAAAGAGTATCGGAATTGTTAAAGAG
Chalcone isomerase	CHI-2	TCTGCTCCCGTTTTGCCCTTCCATTGCTGCAAATGAGTCACAATTTCTGG[T/A]TCCAA GTAAACTCCAATTGCAGTGAATTTAATTTGGAGAAAGTGTATCTC
	CHI-4	AGTCAATATCACCACAACCTCGATTCTTGTGTTGATATATTCTCTTTATG[C/A]CAAAG AAGTAGCTACTTGTGAAGTAGAGAAGCCAAGTTCGACTCGACATC
Flavonoid 3'-hydroxylase	F3'H-1	ACCAATCGACTGCAGCCATGGCCCAAACCTACGGGCCACTCATGCATCTT[G/C]ACTT GGGGTTCGTGGATGTGGTGGTTGCGGCTTCGGCTTCAGTGCGGGT
	F3'H-3	GAGGAAAGACGAATTTTGACCTCTCGCCTTTTTCTCTCTCAGGAAAACC[A/G]TTTTT CTTAAAGACCATTTACCTCTATTTGCTCTTCGCATGATAAGTAGG
Flavanone 3-hydroxylase	F3H	CATTGATTTATCACTTTATAATCATTTCATATAAATAATAAAAAGAAA[C/G]TACCT GGAAAATGCCCAATCTTCGCATGCCT[C/T]TACAATTTTTTACATATTTACCTCTT GTCCAATCTCATCAATATCCT
Flavone synthase	FS-2	GAGAACAAGCTATTAAGATTCTCCACACATTTATTTAACTAATATCTAT[T/A]ACAC ATAATATATCCTCACGCAACGAGGTTAAAATTTTTTTTTATCT
Flavonol synthase	FLS	CAAGAAGTACCATATCCTTCTATACTCTGCGATCCTGGATTCTTCGCAATC[A/C]ACTC TTTCTCCTCTGTGGTACTTGCTCAAAGAACTCCTCCCAACTTTCT
Capsicum MYB12	Ca-MYB12	TTTTCTCATTTGTTGATGACACTGCCTCCTGACTTGATACAGTTTTATT[A/T]CGTTCAT CAATTCTGTGCGTGGTCTGCAGTAATTATTTCTGTTTCGTT

**Supplemental Table 3.2** Semi-polar metabolite composition and mQTLs of F2 population

Dados não apresentados.

**Supplemental Table 3.3** Position of flavonoid SNP markers on genetic map in pepper

No	Locus	Position	Linkage Group
1	Hpms1-281-1_Q1	0,0	
2	P17M32-222	20,3	
3	Hpms1_41-1_Q1	38,4	
4	P14M48-109	46,8	
5	P11M48-242	56,0	
6	E35M58-187	61,1	<b>P01</b>
7	Epms_725-1_Q1	74,2	
8	E36M48-507	84,9	
9	<b>CaMYB12</b>	89,6	
10	P14M41-155	93,6	
11	P14M41-235	106,6	
12	E36M48-407	116,4	
13	Gpms_169-2_Q1	0,0	
14	E38M49-457	24,1	
15	Gpms_37-2_Q1	34,4	
16	P11M48-448	42,1	
17	P11M48-475	44,4	
18	E32M49-267	49,0	<b>P02</b>
19	E35M58-303	66,1	
20	E35M48-250	82,9	
21	P11M48-142	102,7	
22	P11M61-253	112,7	
23	P17M39-130	136,7	
24	E34M48-371	168,6	



<b>No</b>	<b>Locus</b>	<b>Position</b>	<b>Linkage Group</b>
<b>25</b>	<b>P17M39-242</b>	<b>0,0</b>	
<b>26</b>	P14M48-166	20,9	
<b>27</b>	E38M49-668	34,2	<b>P03a</b>
<b>28</b>	Gpms_93-3_Q1	43,2	
<b>29</b>	E38M49-672	52,1	
<b>30</b>	P17M32-201	0,0	
<b>31</b>	P17M32-110	6,4	
<b>32</b>	HpmsE073-3_Q2	10,2	<b>P03b</b>
<b>33</b>	P17M32-191	13,3	
<b>34</b>	P17M32-172	27,8	
<b>35</b>	E32M49-202	39,1	
<b>36</b>	P14M48-286	0,0	
<b>37</b>	HpmsE008-3_Q1	7,5	
<b>38</b>	P17M32-133	16,2	<b>P03c</b>
<b>39</b>	Gpms_198-3_Q1	25,2	
<b>40</b>	Epms_386-3_Q1	40,4	
<b>41</b>	HpmsE122-3_Q3	46,1	
<b>42</b>	HpmsaT2-14-4_Q1	0,0	
<b>43</b>	E38M49-596	23,7	
<b>44</b>	P17M32-151	34,0	
<b>45</b>	HpmsI_165-4_Q1	50,6	<b>P04a</b>
<b>46</b>	E38M49-497	55,0	
<b>47</b>	P11M61-401	62,9	
<b>48</b>	P11M48-220	84,2	
<b>49</b>	HmpsE099-4_Q2ac	0,0	
<b>50</b>	HpmsE055-4_Q1	53,1	<b>P04b</b>
<b>51</b>	HpmsE085-4_Q1	64,2	
<b>52</b>	HpmsE111-4_Q1	73,8	

No	Locus	Position	Linkage Group
53	<b>CHS2</b>	0,0	
54	LM_2001	2,2	
55	HpmsE116_5_Q1	8,8	
56	<b>CHI2</b>	15,4	
57	LM_2004	18,2	
58	LM_2002	21,2	
59	E38M49-544	22,7	<b>P05a</b>
60	LM_2006	23,9	
61	Hpms2_45-5_Q1	25,4	
62	P14M49-195	28,8	
63	E36M48-451	31,8	
64	E36M48-310	37,6	
65	Gpms_165-5_Q2	51,9	
66	Hpms2_23-5_Q1	0,0	
67	HpmsE015-5nw	22,0	<b>P05b</b>
68	E36M48-432	36,2	
69	P14M50-333	51,8	
70	P14M48-323	0,0	
71	E32M49-406	19,8	
72	E32M49-520	48,9	
73	E35M58-446	53,6	<b>P06</b>
74	E35M58-280	61,1	
75	HmpsE113	71,2	
76	Hpms1_5-6_Q1	77,7	
77	Epms_376	79,9	
78	Isotig18917_234	106,6	
79	Isotig18917_361	106,7	
80	Isotig18917_or55	107,4	
81	HpmsE078_Q2	108,1	
82	Isotig18067_441	110,6	
83	HpmsAT2-20	123,7	

No	Locus	Position	Linkage Group
84	P17M32-227	129,1	
85	P11M48-159	148,1	
86	<b>FS</b>	162,1	
87	HpmsE088-6b	168,6	<b>P06</b>
88	<b>CHI4</b>	176,8	
89	HpmsE014_Q1	182,0	
90	E35M49-332	197,9	
91	E36M48-274	0,0	
92	P14M48-282	23,7	
93	E32M49-334	26,7	
94	E32M49-389	29,2	
95	E38M49-306	32,2	
96	HpmsE068-7_Q1	33,7	
97	E38M49-319	40,7	<b>P07</b>
98	E36M48-497	42,0	
99	E38M49-211	45,1	
100	HpmsE057-7_Q1	56,6	
101	P14M48-251	67,6	
102	P14M41-259	93,9	
103	Hpms1-227_Q1	98,5	
104	P17M39-199	104,3	
105	P11M48-289	0,0	
106	Unigene37909_1575	7,6	
107	Unigene37909_1470	8,2	
108	Unigene37909_960	9,0	
109	E38M49-585	23,7	<b>P08</b>
110	P17M32-313	32,9	
111	P17M32-178	36,8	
112	Epms_310-8_Q1	41,2	
113	HpmsE004-1&8_Q1	42,2	
114	Hpms1_148-8_Q1	48,2	

No	Locus	Position	Linkage Group
115	HpmsE115-1&8_Q1	68,2	<b>P08</b>
116	Epms_342-8_Q1	76,2	
117	P11M61-217	85,4	
118	Gpms_194-9_Q1	0,0	<b>P09</b>
119	Hpms1-3_Q1	12,7	
120	E36M48-392	15,1	
121	E32M49-304	21,6	
122	P14M41-256	25,9	
123	E36M48-399	32,8	
124	P14M49-389	46,6	
125	HpmsE051-9_Q1	60,4	
126	Epms_419-9_Q1	64,1	
127	P14M41-408	67,9	
128	HpmsE143-9_Q1	75,6	
129	P11M48-517	99,5	
130	Gpms159-10_Q1	0,0	<b>P10a</b>
131	P17M32-244	16,5	
132	E32M49-192	0,0	<b>P10b</b>
133	E38M49-534	9,3	
134	HpmsE013-10_Q1	14,9	
135	HpmsE059-10_Q1	16,5	
136	Hpms2_21-10_Q2	18,6	
137	HpmsE-065_Q3	23,0	
138	P14M41-176	36,1	
139	HpmsE031_10_Q1	40,5	
140	P14M41-162	43,1	
141	P17M39-172	47,5	
142	HpmsE096-10_Q1	83,0	
143	E35M48-209	0,0	
144	E32M49-401	13,6	
145	E32M49-484	17,5	

<b>No</b>	<b>Locus</b>	<b>Position</b>	<b>Linkage Group</b>
146	Epms_561-11_Q1	23,7	
147	Epms_410-11_Q1	25,3	
148	E38M49-460	27,6	
149	P17M39-228	33,9	
150	Epms_391-11_Q1	39,1	<b>P11</b>
151	Hpms2_2-11_Q1	45,9	
152	P17M39-318	56,3	
153	P17M32-130	74,8	
154	E32M49-501	91,6	
155	HpmsE094-12_Q3	0,0	<b>P12a</b>
156	HpmsE128_12_Q2	21,7	
157	E35M49-121	0,0	
158	HpmsE064-12_Q1	6,4	<b>P12b</b>
159	E32M49-597	33,1	
160	E32M49-590	44,0	
161	P14M50-332	0,0	
162	E38M49-287	11,5	
163	E36M48-178	15,7	<b>X01</b>
164	P14M48-97	21,8	
165	E34M48-360	35,7	
166	E35M58-427	0,0	
167	P11M61-323	25,8	
168	E32M49-412	45,6	
169	E35M48-232	62,9	<b>X02</b>
170	E32M49-414	73,9	
171	E35M58-239	88,6	
172	P14M50-309	0,0	
173	E36M48-369	17,0	<b>X03</b>
174	E35M48-227	31,8	
175	E35M48-377	50,2	

<b>No</b>	<b>Locus</b>	<b>Position</b>	<b>Linkage Group</b>
<b>176</b>	P14M48-87	0,0	
<b>177</b>	E36M48-473	6,4	
<b>178</b>	E35M58-308	17,8	<b>X04</b>
<b>179</b>	E35M58-236	23,5	
<b>180</b>	E35M58-554	30,7	
<b>181</b>	P11M48-333	0,0	
<b>182</b>	P17M39-137	13,3	<b>X05</b>
<b>183</b>	E32M49-584	0,0	
<b>184</b>	E35M48-254	18,5	<b>X06</b>
<b>185</b>	E35M49-329	61,9	

**Supplemental Table 3.4** Putative metabolites associated with a quantitative trait locus

Putative metabolites	Metabolite Group <sup>a</sup>	Linkage Group <sup>b</sup>	Position	Max. LOD <sup>c</sup>	mu_A <sup>d</sup>	mu_H <sup>e</sup>	mu_B <sup>f</sup>	Closest marker
Trihydroxy-phytatetraen-one-acetyl-O-glucose	Acy. Diterp.	P02	21.00	4.4	5.29	6.85	5.11	E38M49-457
Quercetin rhamnoside-glucoside	Flav.	P02	143.72	4.2	5.51	7.22	7.00	P17M39-130
3-Methyl-1-butanol; O-[ <sup>3</sup> -D-Glucopyranosyl-(1 <sup>3</sup> 6)- <sup>3</sup> -D-glucopyranoside]	Ile/leu deriv.	P03c	12.51	3.9	8.20	7.17	6.27	P17M32-133
Flavanone tri-methyl glucose pentose	Flav.	P06	79.86	7.8	5.21	5.20	5.84	Epms_376
Icariside E5	Lignan	P06	141.09	4.2	8.59	9.39	8.18	P11M48-159
Apigenin 6-C-pentoside-8-C-hexoside	Flav.	P06	161.35	5.6	6.68	8.74	8.77	HpmsE088-6b
Apigenin 6,8-di-C-hexoside	Flav.	P06	162.35	8.7	6.97	9.19	9.20	HpmsE088-6b
Luteolin 8-C-hexoside	Flav.	P06	165.35	3.8	6.28	8.13	7.95	HpmsE088-6b
Luteolin 6-C-hexoside	Flav.	P06	167.35	6.9	7.29	9.42	9.30	HpmsE088-6b
capsaicin/capsaicin analogue	Phenylprop.	P07	97.03	3.7	9.88	9.68	9.12	Hpms1-227_Q1
Flavanone tri-methyl glucose pentose	Flav.	P07	101.03	6.1	7.02	5.12	5.41	P17M39-199
Naringenin chalcone	Flav.	P09	13.71	6.7	7.96	8.72	9.86	Hpms1-3_Q1

Putative metabolites	Metabolite Group <sup>a</sup>	Linkage Group <sup>b</sup>	Position	Max. LOD <sup>c</sup>	mu_A <sup>d</sup>	mu_H <sup>e</sup>	mu_B <sup>f</sup>	Closest marker
Luteolin-methyl-acetyl-apiofuranosyl-hexose	Flav.	P09	67.86	4.1	5.93	5.28	5.22	P14M41-408
Capsianoside V	Acy. Diterp.	P09	90.57	6.4	5.84	10.04	10.47	P11M48-517
Capsianoside IX	Acy. Diterp.	P09	93.57	4.2	9.22	7.38	6.15	P11M48-517
Capsicoside	Saponin	P09	94.57	3.7	7.04	5.26	5.21	P11M48-517
Luteolin-methyl-O-di-hexose	Flav.	P09	96.57	6.5	9.95	6.53	5.95	P11M48-517
Capsianoside X-1	Acy. Diterp.	P09	97.57	4.3	10.27	6.45	6.89	P11M48-517
Capsianoside VIII	Acy. Diterp.	P09	98.57	4.6	11.40	7.53	6.97	P11M48-517
Quercetin 3-O-rhamnoside	Flav.	P10b	7.00	4.0	6.28	8.31	8.24	E38M49-534
Ferulic acid-hexose II	Phenylprop.	P11	23.68	4.3	5.90	6.77	7.01	Epms_561-11_Q1
Icariside E5	Lignan	P11	42.12	6.0	8.08	8.91	9.51	Epms_391-11_Q1
Capsianoside IV	Acy. Diterp.	P12b	38.15	3.9	8.72	6.67	5.40	E32M49-597

<sup>a</sup> Metabolites were grouped into flavonoids (Flav.), acyclic diterpenoids (Acy. Diterp.), phenylpropanoids (Phenylprop.), ile/leu derivatives (Ile/leu deriv.), fatty acid derivative (FA deriv.), lignan and saponin

<sup>b</sup> Linkage group was annotated by the chromosome number after the alphabet P and followed by the small alphabet. Linkage map was constructed with AFLP and microsatellite markers as described by Maharijaya et al. (2012b).



<sup>c</sup> LOD = logarithm of odds corresponds to a genome wide confidence level. LOD corresponds to the maximum LOD score.

<sup>d</sup>  $\mu_A$  = trait means of AA homozygous P1, *C. annuum* AC1979 (no. 19)

<sup>e</sup>  $\mu_H$  = trait means of AB heterozygous progeny

<sup>f</sup>  $\mu_B$  = trait means of BB homozygous P2, *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18)

**Supplemental Table 3.5** Flavonoid QTLs and flavonoid candidate gene expression QTLs in pepper

Linkage Group <sup>a</sup>	Gene transcript/ Metabolite	Position	LOD <sup>b</sup>	mu_A <sup>c</sup>	mu_H <sup>d</sup>	mu_B <sup>e</sup>	Locus
<b>P01</b>	<i>Ca-MYB12</i>	89.63	21.9	7.56	10.68	12.47	Ca-MYB12
	<i>CHS-1</i>	89.63	9.6	13.05	15.24	16.53	Ca-MYB12
	<i>CHS-2</i>	89.63	9.9	13.15	15.39	16.57	Ca-MYB12
	<i>CHI-2</i>	89.63	4.6	9.99	10.65	12.35	Ca-MYB12
	<i>FLS</i>	89.63	3.6	6.22	7.18	7.95	Ca-MYB12
	Naringenin Chalcone	89.63	4.1	7.87	8.99	9.38	Ca-MYB12
<b>P03c</b>	<i>F3'H-1</i>	40.38	9.4	12.60	15.40	16.21	Epms_386-3_Q1
<b>P04a</b>	<i>F3'H-3</i>	84.17	7.61	3.19	5.70	5.97	P11M48-220
<b>P06</b>	<i>FS-2</i>	162.13	7.8	7.79	9.08	11.08	FS-2
	Apigenin 6-C- pentoside-8-C- hexoside	162.13	9.0	6.63	8.84	8.83	FS-2
	Luteolin 6-C- hexose	162.13	13.9	6.78	9.64	9.54	FS-2
	Luteolin 8-C- hexose	162.13	8.4	5.82	8.28	8.26	FS-2
	Apigenin 6,8-di-C- hexoside	162.13	15.3	6.86	9.28	9.33	FS-2
	<i>CHI-4</i>	176.82	33.0	13.13	11.67	6.15	CHI-4

Linkage Group <sup>a</sup>	Gene transcript/ Metabolite	Position	LOD <sup>b</sup>	mu_A <sup>c</sup>	mu_H <sup>d</sup>	mu_B <sup>e</sup>	Locus
<b>P06</b>	<i>FS-2</i>	176.82	4.5	8.20	9.03	10.48	CHI-4
	Apigenin 6- <i>C</i> - pentoside-8- <i>C</i> - hexoside	176.82	5.0	7.21	8.61	8.81	CHI-4
	Apigenin 6,8-di- <i>C</i> - hexoside	176.82	7.7	7.53	8.98	9.31	CHI-4
	Luteolin 6- <i>C</i> - hexose	176.82	6.1	7.62	9.32	9.47	CHI-4
	Luteolin 8- <i>C</i> - hexose	176.82	3.6	6.59	8.12	8.04	CHI-4
<b>P08</b>	<i>F3H</i>	23.72	3.9	11.90	12.45	13.29	E38M49-585
<b>P09</b>	<i>CHS-1</i>	15.08	5.8	13.99	14.56	16.34	E36M48-392
	<i>CHS-2</i>	15.08	5.7	14.11	14.71	16.42	E36M48-392
	<i>CHI-1</i>	15.08	3.6	6.28	7.10	8.41	E36M48-392
	<i>CHI-2</i>	15.08	4.2	10.31	10.35	11.75	E36M48-392
	<i>FS-2</i>	15.08	3.6	8.60	9.12	10.65	E36M48-392
	Naringenin chalcone	15.08	6.6	8.00	8.68	9.77	E36M48-392

Linkage Group <sup>a</sup>	Gene transcript/ Metabolite	Position	LOD <sup>b</sup>	mu_A <sup>c</sup>	mu_H <sup>d</sup>	mu_B <sup>e</sup>	Locus
P09	Luteolin methyl acetyl apiofuranosyl hexose	67.86	4.1	5.93	5.28	5.22	P14M41-408
	Luteolin methyl- <i>O</i> - di-hexose	96.57	6.5	9.95	6.53	5.95	P11M48-517

<sup>a</sup> Linkage group was annotated by the chromosome number after the alphabet P and followed by the small alphabet. Linkage map was constructed with AFLP and microsatellite markers as described by Maharijaya et al. (2012b).

<sup>b</sup> LOD = logarithm of odds corresponds to a genome wide confidence level. LOD corresponds to the maximum score at the position of marker

<sup>c</sup> mu\_A = trait means of AA homozygous P1, *C. annuum* AC1979 (no. 19)

<sup>d</sup> mu\_H = trait means of AB heterozygous progeny

<sup>e</sup> mu\_B = trait means of BB homozygous P2, *C. chinense* No. 4661 Selection (no. 18)

The grey boxes indicate the parent of which the trait was derived from

**Supplemental Table 3.6** Pearson correlation analysis of flavone C-glycosides

<b>HCA Order</b>	<b>HCA Group</b>	<b>Putative ID</b>	<b>Correlation value to Apigenin 6,8-di-C-hexoside (R<sup>2</sup>)</b>
249	D	Apigenin 6,8-di-C-hexoside	1
242	D	Apigenin 6-C-pentoside-8-C-hexoside	0.9
244	D	Luteolin 6,8-di-C-hexoside	0.7
245	D	Luteolin 6-C-hexoside-8-C-pentoside	0.6
246	D	Luteolin 6-C-pentoside-8-C-hexoside	0.6
248	D	Luteolin 8-C-hexoside	0.8
250	D	Luteolin 6-C-hexoside	0.9

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sistema antioxidante é uma ferramenta importante na defesa celular contra estresses bióticos e abióticos. As plantas têm mostrado mecanismos que envolvem diferentes compostos nessa ação antioxidante. Estes componentes de frutas e vegetais são capazes de prevenir, em humanos, processos carcinogênicos e doenças cardiovasculares. Dessa maneira, a elucidação da regulação da síntese e dos mecanismos de ação desses compostos antioxidantes é um importante foco de estudo.

Em relação à resposta das plantas ao estresse ambiental, foi observado que o NO age como uma molécula sinalizadora, uma vez que a presença de NO induzido por apocinina causou um aumento nos níveis de transcritos dos genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de glutathiona (*γ-ecs*) e também enzimas do sistema antioxidante (*apx1*, *cat1e sod2*), em uma das variedades de milho analisadas (SHS 3031). A presença do NO foi demonstrada por microscopia de fluorescência, sendo que a indução por apocinina foi observada nas folhas de milho SHS 3031, enquanto que a variedade DKB 240 não apresentou diferença na fluorescência após o tratamento. Esse dado corrobora com a hipótese de que diferentes variedades de milho possam apresentar diferenças na fisiologia e no metabolismo, apresentando variações nos estágios de desenvolvimento ou em resposta aos tratamentos impostos às plantas. Considerando que o crescimento, o desenvolvimento e as respostas ambientais são determinados pela expressão gênica programada e que vários sinais internos são necessários para coordenar essa expressão, estudos envolvendo outras variedades poderiam auxiliar na elucidação da regulação gênica por NO em folhas de milho.

Em frutos de pimenta, combinando QTLs de metabólitos e de expressão e marcadores de genes candidatos, foi observado que alguns genes dos flavonoides são responsáveis por importantes QTLs. Dessa maneira, foi possível obter informações relevantes sobre a regulação molecular da via de síntese dos flavonoides. Atualmente, está sendo desenvolvida uma linhagem recombinante (RIL, geração F6) da população baseada no mesmo cruzamento entre *C. annuum* AC1979 (nº 19) e *C. chinense* No. 4661 Selection (nº 18). Esse material vai ser utilizado para confirmar e testar a força dos QTLs selecionados, utilizando repetições biológicas em diferentes condições ambientais. Considerando que esta abordagem revelou informações valiosas sobre as regiões genômicas importantes para a produção de metabólitos

secundários em frutos de pimenta, pode-se dizer que a combinação de dados genéticos e bioquímicos pode ajudar no desenvolvimento de novas variedades de pimenta que unam sabor e perfil nutricional desejáveis.

Considerando que o milho é uma das culturas com maior área de cultivo no mundo, sendo o Brasil um dos principais produtores, e que esse grão não é utilizado apenas para consumo direto, mas, principalmente, como base para a produção de muitos alimentos, para humanos e animais, estudos que ajudem na elucidação da regulação das vias de síntese de compostos que garantam a essas plantas resistência a danos, como os causados por estresses bióticos e abióticos, tornam-se de grande relevância.

Visto que frutos de pimenta possuem uma grande variedade de compostos bioativos, como carotenoides, capsaicinoides e flavonoides, os quais apresentam conhecidas propriedades de benefícios à saúde, estudos que forneçam informações sobre a regulação da síntese dos metabólitos nesses frutos, tornam-se relevantes na busca de uma relação entre saúde e ingestão de frutas e vegetais.

Desta maneira, esse trabalho analisou essas duas diferentes e importantes culturas brasileiras, revelando pontos importantes da regulação da síntese dos compostos bioativos com propriedades benéficas a saúde humana, enriquecendo o conhecimento da ciência dos alimentos, o qual poderá ser aplicado em futuros trabalho com intuito de produzir alimentos com maior quantidade de antioxidantes, como os flavonoides.

**REFERÊNCIAS**

ADATO, A., MANDEL, T., MINTZ-ORON, S., VENGER, I., LEVY, D., YATIV, M., DOMÍNGUEZ, E., WANG, Z., DE VOS, R.C.H., JETTER, R., SCHREIBER, L., HEREDIA, A., ROGACHEV, I., AHARONI, A. Fruit-surface flavonoid accumulation in tomato is controlled by a *SIMYB12*-regulated transcriptional network. **PLoS Genetics**, v.5, (12):e1000777, 2009.

AGATI, G., AZZARELLO, E., POLLASTRI, S., TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, v.196, p. 67-76, 2012.

AHLFORS, R., BROSCHE, M., KOLLIST, H., KANGASJARVI, J.: Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v.58, p.1-12, 2009.

ALI, M.L., TAYLOR, J.H., JIE, L., SUN, G., WILLIAM, M., KASHA, K.J., REID, L.M., PAULS, K.P. Molecular mapping of QTLs for resistance to *Gibberella* ear rot, in corn, caused by *Fusarium graminearum*. **Genome**, v.48, p.521-33, 2005.

ALIMI, N.A., BINK, M.C.A.M., DIELEMAN, J.A., NICOLAI, M., WUBS, M., HEUVELINK, E., MAGAN, J., VOORRIPS, R.E., JANSEN, J., RODRIGUES, P.C., VAN DER HEIJDEN, G.W.A.M., VERCAUTEREN, A., VUYLSTEKE, M., SONG, Y., GLASBEY, C., BAROCSI, A., LEFEBVRE, V., PALLOIX, A., VAN EEUWIJK, F.A. Genetic and QTL analyses of yield and a set of physiological traits in pepper. **Euphytica**, v.190, p.181-201, 2013.

ALMEIDA, M.R., RUEDELL, C.M., RICACHENEVSKY, F.K., SPEROTTO, R.A., PASQUALI, G., FETT-NETO, A.G. Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during *in vitro* adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill. **BMC Molecular Biology**, 11:73, 2010.

APEL, K., HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolismo, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Reviews of Plant Biology**, v.55, p.373-399, 2004.



ARASIMOWICZ, M., FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress response. **Plant Science**, v.172, p.876-887, 2007.

ARASIMOWICZ-JELONEK, M., FLORYSZAK-WIECZOREK, J., KOSMALA, A. Are nitric oxide donors a valuable tool to study the functional role of nitric oxide in plant metabolism? **Plant Biology**, v.13, p.747-756, 2011.

ARASIMOWICZ-JELONEK, M., FLORYSZAK-WIECZOREK, J., KUBIS, J. Involvement of nitric oxide in water stress-induced responses of cucumber roots. **Plant Science**, v.177, p.682-690, 2009.

ARISI, A.C.M., NOCTOR, G., JOUANIN, L., FOYER, C.H. Manipulation of glutathione and amino acid biosynthesis in the chloroplast. **Plant Physiology**, v.118, p.471 - 482, 1998.

ASHRAFI, H., HILL, T., STOFFEL, K., KOZIK, A., YAO, J., CHINWO, S.R., VAN DEYNZE, A. *De novo* assembly of the pepper transcriptome (*Capsicum annuum*): a benchmark for in silico discovery of SNPs, SSRs and candidate genes. **BMC Genomics**, v.13, p.571-585, 2012.

ASÍNS, M.J. Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. **Plant Breeding**, v.121, p.281-291, 2002.

BALLESTER, A.R., MOLTHOFF, J., DE VOS, R., HEKKERT, B.L., ORZAEZ, D., FERNÁNDEZ-MORENO, J.P., TRIPODI, P., GRANDILLO, S., MARTIN, C., HELDENS, J., YKEMA, M., GRANELL, A., BOVY, A. Biochemical and molecular analysis of pink tomatoes: Deregulated expression of the gene encoding transcription factor *SIMYB12* leads to pink tomato fruit color. **Plant Physiology**, v.152, p.71-84, 2010.

BARCHI, L., LANTERI, S., PORTIS, E., VALE, G., VOLANTE, A., PULCINI, L., CIRIACI, T., ACCIARRI, N., BARBIERATO, V., TOPPINO, L., ROTINO, G.L. A RAD tag derived marker based eggplant linkage map and the location of QTLs determining anthocyanin pigmentation. **PLoS ONE**, v.7:e43740, 2012.

BAUDOIN, E. The language of nitric oxide signaling. **Plant Biology**, v.13, p.233-242, 2011.

BEN-CHAIM, A., BOROVSKY, Y., FALISE, M., MAZOUREK, M., KANG, B.C., PARAN, I., JAHN, M. QTL analysis for capsaicinoid content in Capsicum. **Theoretical and Applied Genetics**, v.113, p.481-1490, 2006.

BESSON-BARD, A., ASTIER, J., RASUL, S., WAWER, I., DUBREUIL- MAURIZI, C., JEANDROZ, S., WENDEHENNE, D. Current view of nitric oxide-responsive genes in plants. **Plant Science**, v.177, p.302-309, 2009.

BETHKE, P.C., LIBOUREL, I.G.L., JONES, R.L. Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p. 517-526, 2006.

BLOKHINA, O., VIROLAINEN, E., FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v. 91: 179-194, 2003.

BLUM, E., LIU, K., MAZOUREK, M., YOO, E.Y., JAHN, M., PARAN, I. Molecular mapping of the C locus for presence of pungency in Capsicum. **Genome**, v.45, p.702-705, 2002.

BLUM, E., MAZOUREK, M., O'CONNELL, M., CURRY, J., THORUP, T., LIU, K.D., JAHN, M., PARAN, I. Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in Capsicum. **Theoretical and Applied Genetics**, v.108, p.79-86, 2003.

BOREVITZ, J.O., XIA, Y., BLOUNT, J., DIXON, R.A., LAMB, C. Activation tagging identifies a conserved myb regulator of phenylpropanoid biosynthesis. **The Plant Cell**, v.12, p.2383-2393, 2000.

BOROVSKY, Y., PARAN, I. Characterization of *fs10.1*, a major QTL controlling fruit elongation in *Capsicum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.123, p.657-665, 2011.

BOVY, A., VOS, R., KEMPER, M., SCHIJLEN, E., PERTEJO, M.A., MUIR, S., COLLINS, G., ROBINSON, S., VERHOEYEN, M., HUGHES, S., SANTOS-BUELGA, C., TUNEN, A. High-Flavonol Tomatoes Resulting from the Heterologous Expression of the Maize Transcription Factor Genes *LCandC1*. **The Plant Cell**, v.14, p.2509–2526, 2002.

BRADSHAW, J.E., HACKETT, C.A., PANDE, B., WAUGH, R. AND BRYAN, G.J. QTL mapping of yield, agronomic and quality traits in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* subsp.*tuberosum*). **Theoretical and Applied Genetics**, v.116, p.193-211, 2008.

BRAND, A., BOROVSKY, Y., MEIR, S., ROGACHEV, I., AHARONI, A., PARAN, I. *pc8.1*, a major QTL for pigment content in pepper fruit, is associated with variation in plastid compartment size. **Planta**, v.235, p.579-588, 2012.

BUTELLI, E., TITTA, L., GIORGIO, M., MOCK, H.P., MATROS, A., PETEREK, S., SCHIJLEN, E.G.W.M., HALL, R.D., BOVY, A.G., LUO, J., MARTIN, C. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. **Nature Biotechnology**, v.26, p.1301-1308, 2008.

CAUSSE, M., DUFFE, P., GOMEZ, M.C., BURET, M., DAMIDAUX, R., ZAMIR, D., GUR, A., CHEVALIER, C., LEMAIRE-CHAMLEY, M., ROTHAN, C. A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1671–1685, 2004.

CHOPRA, S., ATHMA, P., PETERSON, T. Alleles of the maize *P* gene with distinct tissue specificities encode MYB-homologous protein with C-terminal replacement. **Plant Cell**, v.8, p. 1149-1158, 1996.

CHOUDHURY, S., PANDA, P., SAHOO, L., PANDA, S.K. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. **Plant Science & Behavior**, v.8, 2013.

CIKOS, S., BUKOVSKÁ, A., KOPPEL, J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. **BMC Molecular Biology**, 8:113, 2007.

COLLARD, B.C.Y., JAHUFER, M.Z.Z., BROUWER, J.B., PANG, E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait locus (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, v.142, p.169-196, 2005.

COMINELLI, E., GUSMAROLI, G., ALLEGRA, D., GALBIATI, M., WADE, H.K., JENKINS, G.I., TONELLI, C. Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *A. thaliana* **Journal of Plant Physiology**, v.165, p.886-894, 2008.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em 25 fev. 2014.

CORPAS, F.J., LETERRIER, M., VALDERRAMA, R., AIRAKI, M., CHAKI, M., PALMA, J.M., BARROSO, J.B. Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. **Plant Science**, v.181, p.604-611, 2011.

CRAWFORD, N.M. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.471, 2006.

CREUS, C.M., GRAZIANO, M., CASANOVAS, E.M., PEREYRA, M.A., SIMONTACCHI, M., PUNTARULO, S., BARASSI, C.A., LAMATTINA, L. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense* induced lateral root formation in tomato. **Planta**, v.221, p.297-303, 2005.

DE OSTI, R.Z., DA ROSA ANDRADE, J.B., DE SOUZA, J.P., SILVEIRA, V., BALBUENA, T.S., GUERRA, M.P., FRANCO, D.W., SEGAL FLOH, E.I., SANTA-CATARINA, C. Nitrosyl ethylenediaminetetraacetate ruthenium(II) complex promotes cellular growth and could be used as nitric oxide donor in plants. **Plant Science**, v.178, p.448-453, 2010.

DE VOS, R.C.H., MOCO, S., LOMMEN, A., KEURENTJES, J.J.B., BINO, R.J., HALL, R.D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, v.2, p.778-791, 2007.

DEBOO, G.B., ALBERTSEN, M.C., TAYLOR, L.P. Flavanone 3-hydroxylase transcripts and flavonol accumulation are temporally coordinate in maize anthers. **Plant Journal**, v.7, p.703-713, 1995.

DIETZ, K.J. Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.15, p. 1129-1159, 2011

DINON, A.Z. Desenvolvimento de iniciadores e sondas para detecção de cry1A.105 e cry2Ab2 e aplicação de PCR e PCR em tempo real para detecção de OGM em alimentos. 2011. 90p. **Tese** (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DJIAN-CAPORILANO, C., LEFEBVRE, V., SAGE-DAUBEZE, A.M., PALLOIX, A. Capsicum. In: Singh RJ (ed) Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement: Vegetable Crops, vol 3. CRC Press, Boca Raton, p.185-243, 2007.

DOERGE, R.W. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. **Nature Reviews**, v.3, p.4352, 2002.

DUTIELLEUL, C., GARMIER, M., NOCTOR, G., MATHIEU, C., CHÉTRIT, P., FOYER, C.H., PAEPE, R. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. **The Plant Cell**, v.15, p.1212-1226, 2003.

EDERLI, L., REALE, L., MADEO, L., FERRANTI, F., GEHRING, C., FORNACIARI, M., ROMANO, B., PASQUALINI, S. NO release by oxide donors *in vitro* and *in planta*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.47, p. 42-48, 2009.

EFRATI, A., EYAL, Y., PARAN, I. Molecular mapping of the chlorophyll retainer (*cl*) mutation in pepper (*Capsicum* spp.) and

screening for candidate genes using tomato ESTs homologous to structural genes of the chlorophyll catabolism pathway. **Genome**, v.48, p.347-351, 2005.

EGGINK, P.M., MALIEPAARD, C., TIKUNOV, Y., HAANSTRA, J.P.W., BOVY, A.G., VISSER, R.G.F. A taste of sweet pepper: Volatile and non-volatile chemical composition of fresh sweet pepper (*Capsicum annuum*) in relation to sensory evaluation of taste. **Food Chemistry**, v.132, p.301-310, 2012.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Hortaliças – Pimenta (*Capsicum* spp.). Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta\\_capsicum\\_spp/index.html](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/index.html). Acesso em: 25 fev. 2014.

FASOLI, E., PASTORELLO, E.A., FARIOLI, L., SCIBILIA, J., ALDINI, G., CARINI, M., MAROCCO, A., BOSCHETTI, E., RIGHETTI, P.G. Searching for allergens in maize kernels via proteomic tools. **Journal of Proteomics**, v.72, p.501-510, 2009.

FERREIRA, M.L., DOMINGOS, M. Seasonal characterization of antioxidant responses in plants of *Ipomea nil* cv. Scarlet O'Hara. **Brazilian Journal of Biology**, vol.72, p.831-837, 2012.

FERREYRA, M.L.F., RIUS, S., EMILIANI, J., POURCEL, L., FALLER, A., MOROHASHI, K., CASATI, P., GROTEWOLD, E. Cloning and characterization of a UV-B-inducible maize flavonol synthase. **The Plant Journal**, v.62, p.77-91, 2010.

FOYER, C.H. 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.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.H., SHIGEOKA, S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 155, p.93-100, 2011.

FRARY, A., DOGANLAR, S., DAUNAY, M.C., TANKSLEY, S.D. QTL analysis of morphological traits in eggplant and implications for conservation of gene function during evolution of solanaceous species. **Theoretical and Applied Genetics**, v.107, p.359-370, 2003.

FRUNGILLO, L., OLIVEIRA, J.F.P., SAVIANI, E.E., OLIVEIRA, H.C., MARTÍNEZ, M.C., SALGADO, I. Modulation of mitochondrial activity by S-nitrosoglutathione reductase in *Arabidopsis thaliana* transgenic cell lines. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, v.1827, p.239–247, 2013.

GARCIA-MATA, C., LAMATTINA, L. Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. **Plant Physiology**, v.128, p.790-792, 2002.

GELDERMAN, H. Investigation on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. **Methods Theoretical and Applied Genetics**, v.46, p.300-319, 1975.

GILL, S.S., TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidants machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.909-930, 2010.

GIULIETTI, A., OVERBERGH, L., VALCKX, D., DECALLONE, B., BOUILLON, R., MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v.25, p.386-401, 2001.

GÓMEZ, L.D., VANACKER, H., BUCHNER, P., NOCTOR, G., FOYER, C.H. Intercellular distribution of glutathione synthesis in maize leaves and its response to short-term chilling. **Plant Physiology**, v.134, p.1662-1671, 2004.

GONZÁLEZ A., ZHAO, M., LEAVITT, J.M., LLOYD, A.M. Regulation of anthocyanin biosynthetic pathway by

theTTG1/bHLH/MYB transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. **Plant Journal**, v.53, p.814-827, 2008.

GRÜN, S., LINDERMAYR, C., SELL, S., DURNER, J. Nitric oxide and gene regulation in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.507-516, 2006.

GRUPTA, V.K., SHARMA, S.K. Plants as natural antioxidants. **Natural Product Radiance**, vol. 5, p.326-334, 2006.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v.141, p.312-322, 2006.

HOLLAND, J.B. Genetic architecture of complex traits in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, p.156-161, 2007.

HOLLOWAY, B., LI, B. Expression QTLs: applications for crop improvement. **Molecular Breeding**, v.26, p.381-391, 2010.

HOWARD, L.R., WILDMAN, R.E.C. Antioxidant vitamin and phytochemical content of fresh and processed pepper fruit (*Capsicum annuum*). In: Wildman REC (ed) Handbook of nutraceuticals and functional foods. 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, p.165-191, 2007.

HURTADO, P.X., SCHNABEL, S.K., ZABAN, A., VETELÄINEN, M., VIRTANEN, E., EILERS, P.H.C., VAN EEUWIJK, F.A., VISSER, R.G.F., MALIEPAARD, C. Dynamics of senescence-related QTLs in potato. **Euphytica**, v.183, p.289-302, 2012.

INNOCENTI, G., PUCCIARIELLO, C., LE GLEUHER, M., HOPKINS, J., STEFANO, M., DELLEDONNE, M., PUPPO, A., BAUDOUIN, E., FRENDI, P. Glutathione synthesis is regulated by nitric oxide in *Medicago trunculata*. **Planta**, v.225, p.1597-1602, 2007.

IORIZZI, M., LANZOTTI, V., DE MARINO, S., ZOLLO, F., BLANCO-MOLIA, M., MACHO, A., MUNOZ, E. New glycosides from *Capsicum annuum* L. var. *acuminatum*: Isolation, structure



determination, and biological activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.2022-2029, 2001.

IORIZZI, M., LANZOTTI, V., RANALLI, G., DE MARINO, S., ZOLLO, F. Antimicrobial furostanol saponins from the seeds of *Capsicum annuum* L. var. *acuminatum*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p.4310-4316, 2002.

KENIS, K., KEULEMANS, J., DAVEY, M.W. Identification and stability of QTLs for fruit quality traits in apple. **Tree Genetics e Genomes**, v.4, p.647-661, 2008.

KEURENTJES, J.J.B., FU, J., DE VOS, C.H.R., LOMMEN, A., HALL, R.D., BINO, R.J., VAN DER PLAS, L.H.W., JANSEN, R.C., VREUGDENHIL, D., KOORNNEEF, M. The genetics of plant metabolism. **Nature Genetics**, v.38, p.842-849, 2006.

KOVACIK, J., GRUZ, J., KLEJDUS, B., STORK, F., MARCHIOSI, R., FERRARESE-FILHO, O. Lignification and related parameters in copper-exposed *Matricaria chamomilla* roots: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO in this process. **Plant Science**, v.179, p.383-389, 2010.

LAWRENCE, C.J., HARPER, L.C., SCHAEFFER, M.L., SEN, T.Z., SEIGFRIED, T.E., CAMPBELL, D.A. MaizeGDB: The Maize Model Organism Database for Basic, Translational, and Applied Research. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2008, 2008.

LEA, U., SLIMESTAD, L., SMEDVIG, P., LILLO, C. Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. **Planta**, v.225, p.1245-1253, 2007.

LECLERE, S., SCHMELZ, E.A., CHOUREY, P.S. Phenolic compounds accumulate specifically in maternally-derived tissues of developing maize kernels. **Cereal Chemistry**, v.84, p.350-356, 2007.

LEE, H.R., BAE, I.H., PARK, S.W., KIM, H.J., MIN, W.K., HAN, J.H., KIM, K.T., KIM, B.D. Construction of an integrated pepper map using

RFLP, SSR, CAPS, AFLP, WRKY, rRAMP, and BAC End Sequences. **Molecular Cell**, v.27, p.21-37, 2009.

LEE, J., HONG, J.H., WAHNG DO, J., YOON, J.B. Identification of QTLs for resistance to anthracnose to two *Colletotrichum* species in pepper. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v.13, p.227-233, 2010.

LEE, J.H., KIYOTA, N., IKEDA, T., NOHARA, T. Acyclic diterpene glycosides, capsianosides VIII, IX, X, XIII, XV and XVI from the fruits of paprika *Capsicum annuum* L. var. grossum BAILEY and Jalapeno *Capsicum annuum* L. var. annuum. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.54, p.1365-1369, 2006.

LEFEBVRE, V., KUNTZ, M., CAMARA, B., PALLOIX, A. The capsanthin-capsorubin synthase gene: A candidate gene for the y locus controlling the red fruit colour in pepper. **Plant Molecular Biology**, v.36, p.785-789, 1998.

LEPINIEC, L., DEBEAUJON, I., ROUTABOUL, J.M., BAUDRY, A., POURCEL, L., NESI, N., CABOCHE, M. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. **Annual Review of Plant Biology**, v.57, p.404-430, 2006.

LILLO, C., LEA, U., RUOFF, P. Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. **Plant, Cell and Environment**, v.31, p.587-601, 2008.

LINDERMAYR, C., SAALBACH, G., DURNER, J. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.137, p. 921-930, 2005.

LIPP, M., SHILLITO, R., GIROUX, R., SPIEGELHALTER, F., CHARLTON, S., PINERO, D., SONG, P. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. **Journal of AOAC International**, v.88, p.136-155, 2005.

LIVAK, K.J., 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.

LOMBARDI, L., CECCARELLI, N., PICCIARELLI, P., SORCE, C., LORENZI, R. Nitric oxide and hydrogen peroxide involvement during programmed cell death of *Sechium edule* nucellus. **Physiologia Plantarum**, v.140, p.89-102, 2010.

LOMMEN, A., KOOLS, H.J. MetAlign 3.0: Performance enhancement by efficient use of advances in computer hardware. **Metabolomics**, v.8, p.719-726, 2012.

LONGHI, S., HAMBLIN, M.T., TRAINOTTI, L., PEACE, C.P., VELASCO, R., COSTA, F. A candidate gene based approach validates *Md-PG1* as the main responsible for a QTL impacting fruit texture in apple (*Malus x domestica* Borkh) **BMC Plant Biology**, v.13, p.37-49, 2013.

LONGHI, S., MORETTO, M., VIOLA, R., VELASCO, R., COSTA, F. Comprehensive QTL mapping survey dissects the complex fruit texture physiology in apple (*Malus x domestica* Borkh.) **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.1107-1121, 2012.

MACKAY, T.F.C., STONE, E.A., AYROLES, J.F. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. **Nature Reviews**, v.10, p.565-578, 2009.

MAHARIJAYA A., VOSMAN, B., VERSTAPPEN, F., STEENHUIS-BROERS, G., MUMM, R., PURWITO, A., VISSER, R.G., VOORRIPS, R.E. Resistance factors in pepper inhibit larval development of thrips (*Frankliniella occidentalis*). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.145, p.62-71, 2012a.

MAHARIJAYA, A., VOSMAN, B., STEENHUIS-BROERS, G., HARPENAS, A., PURWITO, A., VISSER, R.G.F., VOORRIPS, R.E. Screening of pepper accessions for resistance against two thrips species (*Frankliniella occidentalis* and *Thrips parvispinus*). **Euphytica**, v.177, p.401-410, 2011.

MAHARIJAYA, A., VOSMAN, B., STEENHUIS-BROERS, G., PELGROM, K., HARPENAS, A., PURWITO, A., VISSER, R.G.F., VOORRIPS, R.E. QTL mapping of thrips resistance in pepper (*Capsicum*) in an interspecific cross between *C. annuum* and *C. chinense*. Dissertation, Wageningen University and Research, 2012b.

MANDAL, S., YADAV, S., YADAV, S., NEMAR, R.K. Antioxidants: A Review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.1, p.102-104, 2009.

MARÍN, A., FERRERES, F., TOMÁS-BARBERÁN, F.A., GIL, M.I. Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.3861-3869, 2004.

MAZOUREK, M., PUJAR, A., BOROVSKY, Y., PARAN, I., MUELLER, L., JAHN, M.M. A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. **Plant Physiology**, v.150, p.1806-1821, 2009.

McGONIGLE, B., KEELER, S.J., LAN, S.M.C., KOEPPE, M.K., O'KEEFE, D.P. A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. **Plant Physiology**, v.124, p.1105-1120, 2000.

MEILHOC, E., BOSCARI, A., BRUAND, C., PUPPO, A., BROUQUISSE, R. Nitric oxide in legume-rhizobium symbiosis. **Plant Science**, v.181, p.573-581, 2011.

MELLO, C.S., HERMES, V.S., GUERRA, M.P., ARISI, A.C.M. Sodium nitroprusside modulates gene expression involved in glutathione synthesis in *Zea mays* leaves. **Biologia Plantarum**, v.56, p.383-388, 2012.

MODOLO, L.V., AUGUSTO, O., ALMEIDA, I.M.G., PINTO-MAGLIO, C.A.F., OLIVEIRA, H.C., SELIGMAN, K., SALGADO, I. Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *A. thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. **Plant Science**, v.171, p.34-40, 2006.

MOREAU, M., LINDERMAYR, C., DURNER, J., KLESSIG, D.F. NO synthesis and signaling in plants - where do we stand? **Physiologia Plantarum**, v.138, p.372-383, 2010.

MUIR, S.R., COLLINS, G.J., ROBINSON, S., HUGHES, S., BOVY, A., DE VOS, R.C.H., VAN TUNEN, A.J., VERHOEYEN, M.E. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. **Nature Biotechnology**, v.19, p.470-474, 2001.

MULLINEAUX, P.M., RAUSCH, T. Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. **Photosynthetic Resource**, v.86, p.459-474, 2005.

NOCTOR, G., ARISI, A.C.M., JOUANIN, L., KUNERT, K., RENNENBERG, H., FOYER, C.H. Review article. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. **Journal of Experimental Botany**, v.49, p.623-647, 1998.

NOCTOR, G., FOYER, C.H. Simultaneous measurement of foliar glutathione,  $\gamma$ -glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione. **Analytical Biochemistry**, v.264, p.98-110, 1998.

NOCTOR, G., GOMEZ, L., VANACKER, H., FOYER, C.H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1283-1304, 2002.

NOCTOR, G., MHAMDI, A., CHAOUCH, S., HAN, Y., NEUKERMANS, J., MARQUEZ-GARCIA, B., QUEVAL, G., FOYER, C.H. Glutathione in plants: an integrated overview. **Plant, Cell and Environment**, v.35, p.454-484, 2012.

PAGNUSSAT, G.C., SIMONTACCHI, M., PUNTARULO, S., LAMATTINA, L. Nitric Oxide Is Required For Root Organogenesis. **Plant Physiology**, v.129, p.954-6, 2002.

PALAFIX-CARLOS, H., AYALA-ZAVALA, J.F., GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. **Journal of Food Science**, v.76, p.6-15, 2011.

PARAN, I., VAN DER KNAAP, E. Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.841-852, 2007.

PARAN, I., VAN DER VOORT, J.R., LEFEBVRE, V., JAHN, M., LANDRY, L., VAN SCHRIEK, M., TANYOLAC, B., CARANTA, C., CHAIM, A.B., LIVINGSTONE, K., PALLOIX, A., PELEMAN, J. An integrated genetic linkage map of pepper (*Capsicum* spp.). **Molecular Breeding**, v.13, p.251-261, 2004.

PARK, M., PARK, J., KIM, S., KWON, J.K., PARK, H.M., BAE, I.H., YANG, T.J., LEE, Y.H., KANG, B.C., CHOI, D. Evolution of the large genome in *Capsicum annuum* occurred through accumulation of single-type long terminal repeat retrotransposons and their derivatives. **Plant Journal**, v.69, p.1018-1029, 2012.

PATEL, V.R., PATEL, P.R., JAKAL, S.S. Antioxidant activity of some selected medicinal plants in Western region of India. **Advances in Biological Research**, v.4, p.23-26, 2010.

PETRUSSA, E., BRAIDOT, E., ZANCANI, M., PERESSON, C., BERTOLINI, A., PATUI, S., VIANELLO, A. Plant flavonoids – Biosynthesis, transport and involvement in stress responses. **International Journal of Molecular Science**, v.14, p.14950-14973, 2013.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.00, 2001.

PINTO, M.C., PARADISO, A., LEONETTI, P., DE GARA, L. Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death **Plant Journal**, v.48, p.784-795, 2006.

PRADEDOVA, E.V., ISHEEVA, O.D., SALYAEV, R.K. Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.58, p.210-217, 2011.

RAO, G.U., BEM-CHAIM, A., BOROVSKY, Y., PARAN, I. Mapping of yield-related QTLs in pepper in an interspecific cross of *Capsicum annuum* and *C. frutescens*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.1457-1466, 2003.

RIBAUT, J.M., RAGOT, M. Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the backcross approach, perspectives, limitations, and alternatives. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.351-360, 2007.

RIGANTI C, COSTAMAGNA C, DOUBLIER S, MIRAGLIA E, POLIMENI M, BOSIA A, GHIGO D. The NADPH oxidase inhibitor apocynin induces nitric oxide synthesis via oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.228, p.277-285, 2007.

ROCA, M., HORNERO-MENDEZ, D., GANDUL-ROJAS, B., MINGUEZ-MOSQUERA, M.I. Stay-green phenotype slows the carotenogenic process in *Capsicum annuum* (L.) fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.8782-8787, 2006.

ROUTABOUL, J.M., KERHOAS, L., DEBEAUJON, I., POURCEL, L., CABOCHE, M., EINHORA, J., LEPINIEC, L. Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v.224, p.96-107, 2006.

RUIJTER, J.M., RAMAKERS, C., HOOGAARS, W.M.H., KARLEN, Y., BAKKER, O., VAN DEN HOFF, M.J.B., MOORMAN, A.F.M. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 6, 2009.

SCHIJLEN, E.G.W.M., DE VOS, R.C.H., VAN TUNEN, A.J., BOVY, A.G. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. **Phytochemistry**, v.65, p.2631-2648, 2004.

SCHMITTGEN, T.D., LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. **Protocol**, v.3, p.1101-1108, 2008.

SCHNEIDER, K.A., GRAFTON, K.F., KELLY, J.D. QTL Analysis of Resistance to *Fusarium* root rot in bean. **Crop Science**, v.41, p.535-542, 2001.

SELIGMAN, K., SAVIANI, E.E., OLIVEIRA, H.C., PINTO-MAGLIO, C.A.F., SALGADO, I. Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase-deficient plants. **Plant Cell Physiology**, v.49, p.1112–1121, 2008.

SEMAGN, K., BJØRNSTAD, Å., NDJONDJOP, M.N. An overview of molecular marker methods for plant. **African Journal of Biotechnology**, v.25, p.2540-2569, 2006.

SEMAGN, K., BJØRNSTAD, Å., XU, Y. The genetic dissection of quantitative traits in crops. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.13, 2010.

SERPA, V., VERNAL, J., LAMATTINA, L., GROTEWOLD, E., CASSIA, R., TERENCEZI, H. Inhibition of *AtMYB2* DNA-binding by nitric oxide involves cysteine S-nitrosylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.361, p.1048-1053, 2007.

SHAN, C., HE, F., XU, G., HAN, R., LIANG, Z. Nitric oxide is involved in the regulation of ascorbate and glutathione metabolism in *Agropyron cristatum* leaves under water stress. **Biologia Plantarum**, v.56, p.187-191, 2012.

SHAO, H.B., CHU, L., LU, Z.H., KANG, C.M. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. **International Journal of Biological Sciences**, v.4, p.8-14, 2008.

SHARMA, P., JHA, A.B., DUBEY, R.S., PESSARAKLI, A. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v.2012, p.26, 2012.



SIMPSON, D.A.C., FEENEY, S., BOYLE, C., STITT, A.W. Retinal VEGF mRNA measured by SYBR Green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. **Molecular Vision**, v.6, p.178-183, 2000.

SPADARO, D., YUN, B.W., SPOEL, S.H., CHU, C., WANG, Y.Q., LOAKE, G.J. The redox switch: dynamic regulation of protein function by cysteine modifications. **Physiologia Plantarum**, v.138, p.360-371, 2010.

STEFANO M, VANDELLE E, POLVERARI A, FERRARINI A, DELLEDONNE M. Nitric oxide-mediated signaling functions during the plant hypersensitive response. **Plant Cell Monographs**, v.6, p.207-222, 2006.

STEFANO, M., FERRARINI, A., DELLEDONNE, M. Nitric oxide in the plant hypersensitive disease resistance response. **BMC Plant Biology**, v.5, S10, 2005.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. Apocynin: molecular aptitudes. **Mediators of Inflammation**, Article ID 106507, 2008.

STEFFEN, Y., SCHEWE, T., SIES, H. (-)-Epicatechin elevates nitric oxide in endothelial cells via inhibition of NADPH oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.359, p.828–833, 2007.

STEVENS, R., BURET, M., DUFFÉ, P., GARCHERY, C., BALDET, P., ROTHAN, C., CAUSSE, M. Candidate genes and quantitative trait loci affecting fruit ascorbic acid content in three tomato populations. **Plant Physiology**, v.143, p.1943-1953, 2007.

STRACKE, R., ISHIHARA, H., HUEP, G., BARSCH, A., WEISSHAAR, B. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedlings. **The Plant Journal**, v.50, p.660-677, 2007.

TACHAKITTIRUNGROD, S., OKONOGLI, S., CHOWWANAPHOONPHON, S. Study on antioxidant activity of certain

plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. **Food Chemistry**, v.103, p.381-398, 2007.

TAYLOR, L.P., GROTEWOLD, E. Flavonoids as developmental regulators. **Plant Biology**, v.8, p.317-323, 2005.

TIKUNOV, Y., LOMMEN, A., DE VOS, C.H.R., VERHOEVEN, H.A., BINO, R.J., HALL, R.D., BOVY, A.G. A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics large-scale profiling of tomato fruit volatiles. **Plant Physiology**, v.139, p.:1125-1137, 2005.

TIKUNOV, Y.M., LAPTENOK, S., HALL, R.D., BOVY, A., DE VOS, R.C.H. MSClust: a tool for unsupervised mass spectra extraction of chromatography-mass spectrometry ion-wise aligned data. **Metabolomics**, v.8, p.714-718, 2012.

TOHGE T., MATSUI, K., OHME-TAKAGI, M., YAMAZAKI, M., SAITO, K. Enhanced radical scavenging activity of genetically modified Arabidopsis seeds. **Biotechnology Letters**, v.27, p.297-303, 2005.

TOSSI, V., AMENTA, M., LAMATTINA, L., CASSIA, R. Nitric oxide enhance plant ultraviolet-B protection up-regulation gene expression of the phenylpropanoid biosynthetic pathway. **Plant, Cell and Environmental**, v.34, p.909-921, 2011.

TOSSI, V., CASSIA, R., LAMATTINA L. Apocynin-induced nitric oxide production confers antioxidant protection in maize leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.166, p.1336-1441, 2009.

TOSSI, V., LAMATTINA, L., CASSIA, R. A possible mechanism for the apocynin-induced nitric oxide accumulation in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.4, p.880-882, 2009.

VAN OOIJEN, J.W. JoinMap 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Plant Research International and Kyazma B.V., Wageningen, 2006.

VAN OOIJEN, J.W. MapQTL 6, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. Kyazma B.V., Wageningen, 2009.

VANACKER, H., CARVER, T.L.W., FOYER, C.H. Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in mesophyll cells lead to induction of glutathione during the hypersensitive response in the barley-powdery mildew interaction. **Plant Physiology**, v.123, p.1289-13000. 2000.

VARSHNEY, R.K., GRANER, A., SORRELLS, M.E. Genomics-assisted breeding for crop improvement. **TRENDS in Plant Science**, v.10, p.621-630, 2005.

VRANOVA, E., ATICHARTPONGKUL, S., VILLARROEL, R., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D., AND VAN CAMP, W. Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v.99, p.10870-10875, 2002.

WAHYUNI, Y., BALLESTER, A.R., SUDARMONOWATI, E., BINO, R.J., BOVY, A.G. Metabolite biodiversity in peper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: variation ion health-related compounds and implications for breeding. **Phytochemistry**, v.72, p.1358-1370, 2011.

WAHYUNI, Y., BALLESTER, A-R., TIKUNOV, Y., DE VOS, R., PELGROM, K., MAHARIJAYA, A., SUDARMONOWATI, E., BINO, R., BOVY, A. Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity. **Metabolomics**, v.1, p.130-144, 2013.

WEIGHARDT, F., BARBATI, C., PAOLETTI, C., QUERCI, M. KAY, S., DE BEUCKELEER, M., VAN DEN EEDE, G. Real-time PCR based approach for quantification of the pat gene in the T25 Zea Mays event. **Journal of AOAC International**, v.87, n.6, p.1342-55, 2004.

WINKEL-SHIRLEY B. Flavonoid Biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, v.126, p.485-493, 2001.

WISEMAN, G. State of the art and limitations of quantitative polymerase chain reaction. **Journal of AOAC International**, v. 85, n.3, p.792-796, 2002.

WISSER, R.J., KOLKMAN, J.M., PATZOLDT, M.E., HOLLAND, J.B., YU, J., KRAKOWSKY, M., NELSON, R.J., BALINT-KURTI, P.J. Multivariate analysis of maize disease resistances suggests a pleiotropic genetic basis and implicates a GST gene. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v.108, p.7339-7344, 2011.

WU, F.N., EANNETTA, N.T., XU, Y.M., DURRETT, R., MAZOUREK, M., JAHN, M.M., TANKSLEY, S.D. A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.118, p.1279-1293, 2009.

XIANG, C., WERNER, B.L., CHRISTENSEN, E.M., OLIVER, D.J. The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. **Plant Physiology**, v.126, p.564-574, 2001.

YAHARA, S., URA, T., SAKAMOTO, C., NOHARA, T. Steroidal glycosides from *Capsicum annuum* (The International Journal of Plant Biochemistry). **Phytochemistry**, v.37, p.831-835, 1994.

YI, G.B., LEE, J.M., LEE, S., CHOI, D., KIM, B.D. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, v.114, p.113-130, 2006.

ZAGO, E., MORSA, S., DAT, J.F., ALARD, P., FERRARINI, A., INZÉ, D., DELLEDONNE, M., VAN BREUSEGEM, F. NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-responsive gene regulation during cell death induction. **Plant Physiology**, v.141, p.404-411, 2006.

ZENG, C.L., LIU, L., WANG, B.R., WU, X.M., ZHOU, Y. Physiological effects of exogenous nitric oxide on *Brassica juncea*

seedlings under NaCl stress. **Biologia Plantarum**, v.55, p.345- 348, 2011.

ZHANG, A., JIANG, M., ZHANG, J., DING, H., XU, S., HU, X., TAN, M. Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. **New Phytologist**, v.175, p.36-50, 2007.

ZHANG, A., JIANG, M., ZHANG, J., TAN, M., HU, X. Mitogen-activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. **Plant Physiology**, v.141, p.475-487, 2006.

ZHANG, F., GONZALEZ, A., ZHAO, M., PAYNE, C.T., LLOYD, A. A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of Arabidopsis. **Development**, v.130, p.4859-4869, 2003.

ZHANG, L.Y., SUN, M.X. Fast determination of glutathione by capillary electrophoresis with fluorescence detection using B-cyclodextrin as modifier. **Journal of Chromatography B**, v.877, p.4051-4041, 2009.

ZYGIER, S., BEM-CHAIM, A., EFRATI, A., KALUZKY, G., BOROVSKY, Y., PARAN, I. QTLs mapping for fruit size and shape in chromosomes 2 and 4 in pepper and a comparison of the pepper QTL map with that of tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, v.111, p.437-445, 2005.