

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS  
GENÉTICOS VEGETAIS**

Pâmela Dall'Asta

**EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA ANTIOXIDANTE  
MEDIADA POR ÁCIDO ABCÍSIKO EM FOLHAS DE MILHO  
(*Zea mays* L.)**

Florianópolis  
2013



Pâmela Dall'Asta

**EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA ANTIOXIDANTE  
MEDIADA POR ÁCIDO ABCÍSIKO EM FOLHAS DE MILHO  
(*Zea mays* L.)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências, área de concentração Recursos Genéticos Vegetais.

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

Florianópolis  
2013

Dall' Asta, Pâmela

Expressão de genes do sistema antioxidante mediada por ácido abscísico em folhas de milho (*Zea mays* L.) / Pâmela Dall' Asta ; orientadora, Ana Carolina Maisonnave Arisi - Florianópolis, SC, 2013.

115 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Ácido abscísico. 3. Expressão gênica. 4. Milho. 5. Antioxidantes. I. Arisi, Ana Carolina Maisonnave. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

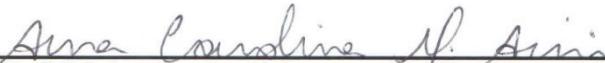
# Expressão de genes do sistema antioxidante mediado por ácido abscísico em plântulas de milho (*Zea mays* L.)

por

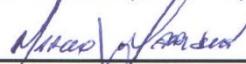
**Pâmela Dall'Asta**

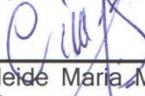
Dissertação julgada e aprovada em 25/02/2013, em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

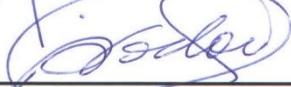
Banca Examinadora:

  
Profª Drª. Ana Carolina Maisonnave Arisi (Presidente /Orientador)

  
Profª. Drª. Roseli Wassem (UFPR-PR)

  
Prof. Dr. Marcelo Maraschin (CCA/UFSC)

  
Profª. Drª. Cileide Maria Medeiros Coelho de Arruda Souza (CAV/UDESC)

  
Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2013



Este trabalho é dedicado a meu pai...porque o que não é dito com palavras é sentido com o coração...



## AGRADECIMENTOS

A Deus ...

A meu pai, Ademir, pelo pão nosso de cada dia, pela busca constante e incessante do melhor para as filhas, pela pessoa bondosa que é e pelo caráter que possui.

Um agradecimento profundo e especial a Rosana, minha mãe: pela dedicação, pelo carinho e amor dispensados, pela força emanada, fortaleza da família.

A minha irmã Mônica pela sua alegria contagiante. Pela coragem mostrada em momentos delicados, agradeço. Por compensar minha falta junto à família.

Ao meu namorado, companheiro, amigo fiel, Gean, por tantas alegrias, momentos compartilhados e por ter escolhido estar ao meu lado, pelos auxílios no dia-a-dia, um especial muito obrigada.

Agradeço à professora Ana Carolina Maisonnave Arisi, pela oportunidade de ingressar em seu grupo de pesquisa, pela orientação, ensinamentos e pela confiança depositada.

A colega e amiga Vanessa Hermes, que sempre presente, me amparou em meus momentos difíceis. Também pelos momentos de descontração e pelos ensinamentos. Do mesmo modo, à Fernanda Plucani do Amaral, pelos auxílios e pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, todos prestativos e de grande auxílio na execução desse trabalho, cada um da sua maneira, Carla, Geisi, Tomás, Pedro, Eliandro, Gustavo, Fábio, Alex, Ângelo, Cibele. Pelo agradável convívio diário.

A Gabriela Barbosa Rossi, pela prestação de ajuda, sempre disposta. Também às outras meninas da iniciação científica, tão importantes para o bom funcionamento do laboratório.

As colegas da Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) Marília Shibata e Rafaela Duarte de Liz, pelos momentos compartilhados.

Aos professores do RGV pela oportunidade de ingresso no curso.

A Berna, pela eficiência e rapidez na resolução dos (eventuais) problemas.

Agradeço ainda a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 471017/2010-8, pelo financiamento do projeto.



“O falso é suscetível a uma infinidade de combinações, a verdade, porém, só possui uma maneira de ser.”

(Jean-Jacques Rousseau, 1750)



## RESUMO

O hormônio ácido abscísico (ABA) participa da sinalização celular em situações de estresse. Buscou-se, nesse estudo, verificar a expressão de genes envolvidos no sistema antioxidante em resposta ao ABA de uma variedade de milho com baixa produção de flavonoides (p1-ww). Foram aplicadas às plântulas concentrações crescentes de ABA, sendo controle (água), 10, 100 e 1000  $\mu\text{M}$ . As coletas das folhas medianas foram realizadas após 3, 6 e 12 horas de tratamento. As amostras foram usadas para posterior isolamento do RNA, síntese de cDNA e qRT-PCR. Foi realizada a quantificação relativa (método do  $\Delta\text{Ct}$ ) dos transcritos de *actina* (*act*), *Zm actina* (*Zmact*),  *$\gamma$ -glutamilmcisteína sintetase* ( *$\gamma$ -ecs*), *glutathiona sintetase* (*gsh-s*), *glutathiona redutase* (*gsr1*), *glutathiona S-transferase* (*gst23*), *ascorbato peroxidases* (*apx1* e *apx2*), *catalases* (*cat1* e *cat3*) e *superóxido dismutase* (*sod2*), em relação aos transcritos de  *$\alpha$ -tubulina* (*tub*), gene de referência. O experimento foi repetido três vezes. Foram realizadas análises estatísticas pelo teste de Kruskal-Wallis, com 99% de significância e o grupo 1000  $\mu\text{M}$  de ABA foi excluído das análises por apresentar variação do transcrito *tub*. Os resultados mostraram que não houve modificação de expressão dos genes *cat3*, *apx2* e *gsr1* em resposta ao tratamento com ABA. Porém, os genes *cat1*, *apx1*, *sod2*,  *$\gamma$ -ecs*, *gsh-s* e *gst23* mostraram expressão diferencial. O aumento significativo mais frequente ocorreu das amostras controle para as tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de ABA, ocorrendo aumento após 3, 6 e 12 horas de tratamento dos genes *act*, *Zmact*, *cat1* e *gst23*. Já para *sod2* e  *$\gamma$ -ecs* houve aumento em 100  $\mu\text{M}$  de ABA após 6 e 12 horas, para *gsh-s* após 3 e 6 horas e para o transcrito de *apx1* após 6 horas. O aumento observado, em uma variedade de milho com expressão diminuída de flavonoide, na expressão de 6 genes envolvidos no sistema antioxidante em resposta ao tratamento das folhas com 100  $\mu\text{M}$  de ABA, confirma que o ABA age como mediador do sistema antioxidante da célula vegetal.

**Palavras-chave:** Milho. ROS. qRT-PCR. Estresse oxidativo. ABA.



## ABSTRACT

The hormone abscisic acid (ABA) participates of the cell signaling in stresses conditions. The aim of this study was to verify gene expression involved in the antioxidant system during ABA treatment of a maize variety with low flavonoid content (p1-ww). Leaves were treated with increasing concentrations of ABA solution: control (water), 10, 100 and 1000  $\mu\text{M}$  in three biological replicates. The second leaves were sampled after 3, 6 and 12 hours, RNA was isolated and transcript levels were quantified through qRT-PCR by the  $\Delta\text{Ct}$  method. The transcript levels of *actin* (*act*), *Zm actin* (*Zmact*),  *$\gamma$ -glutamylcysteine synthetase* ( *$\gamma$ -ecs*), *glutathione synthetase* (*gsh-s*), *glutathione reductase* (*gsr1*), *glutathione S-transferase* (*gst23*), *ascorbate peroxidases* (*apx1* e *apx2*), *catalases* (*cat1* e *cat3*) and *superoxide dismutase* (*sod2*) were compared to  *$\alpha$ -tubulin* (*tub*) transcript levels. The statistical analysis were performed using the Kruskal-Wallis test, 99% confidence and the samples treated with the ABA 1000  $\mu\text{M}$  solution were excluded from the analysis due to high variation of *tub* transcript levels. It was not observed transcript levels variation for *cat3*, *apx2* and *gsr1* in response to ABA treatments. However, we observed significant transcript levels changes of *cat1*, *apx1*, *sod2*,  *$\gamma$ -ecs*, *gsh-s* and *gst23*. The most significant change was the increase of the transcript levels from the control samples to 100  $\mu\text{M}$  ABA samples. *Act*, *Zmact*, *cat1* and *gst23* transcripts showed increased levels after 3, 6 and 12 hours. Moreover, the same increase occurred to *sod2* and  *$\gamma$ -ecs* transcripts after 6 and 12 hours, for *gsh-s* transcripts after 3 and 6 hours and for *apx1* transcripts after 6 hours. Making use of a maize variety with low flavonoid content, we observed increases in transcript levels of 6 genes involved in antioxidant system when leaves were treated with 100  $\mu\text{M}$  ABA. It confirms that ABA mediates antioxidant system in the plant cell.

**Keywords:** Maize. ROS. qRT-PCR. Oxidative stress. ABA.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da fotossíntese em plantas C4. ....	29
Figura 2 - Fenótipo das variedades de milho P1rr, P1-rw, P1-wr e p1-ww. ....	32
Figura 3 – Movimento do peróxido de hidrogênio na célula vegetal. ...	37
Figura 4 - Ciclo do ascorbato/glutathiona. ....	40
Figura 5 – Representação esquemática da rota da biossíntese da glutathiona. ....	42
Figura 6 - Fórmula química do ABA. ....	47
Figura 7 – Rota de biossíntese do ABA. ....	50
Figura 8 - Cultivo das plantas nas sementeiras sob condições controladas. ....	61
Figura 9 – Plântulas nos tratamentos. ....	62
Figura 10 – Curvas de amplificação de cada alvo referente às titulações das concentrações estabelecidas para pares de iniciadores, amostra controle, em triplicata. ....	71
Figura 11 – Curvas de dissociação ( <i>melting</i> ) referentes às titulações das concentrações estabelecidas para cada par de iniciadores, amostra controle, em triplicata. ....	72
Figura 12 – Níveis de expressão gênica de <i>act</i> , <i>Zmact</i> e média geométrica entre <i>tub/Zmact</i> pelo cálculo $2^{-Ct}$ ....	73
Figura 13 - Níveis de expressão gênica (pelo cálculo $2^{-Ct}$ ) de <i>tub</i> em resposta aos tratamentos com 0, 10, 100 ou 1000 $\mu$ M de ABA. ....	74
Figura 14 - Curvas-padrão obtidas para validação de amplificação dos alvos. Placa de PCR número 1 ( <i>tub I</i> , <i>apx2</i> , <i>cat1</i> e <i>cat3</i> ). ....	77

Figura 15 - Curvas-padrão obtidas para validação de amplificação dos alvos. Placas de PCR número 2 ( <i>tub</i> II e <i>apx1</i> ), número 3 ( <i>tub</i> III, <i>gsr1</i> e <i>Zmact</i> ). .....	78
Figura 16 - Delta Ct (Ct gene alvo – Ct gene de referência) para cada diluição de cDNA <i>versus</i> logaritmo da diluição seriada do cDNA .....	79
Figura 17 - Nível de expressão relativa dos genes <i>act</i> , <i>Zmact</i> , <i>cat1</i> e <i>cat3</i> , em folhas da variedade de milho p1-ww tratadas por 3, 6 e 12 horas com 0, 10, 100 ou 1000 $\mu$ M de ABA.....	82
Figura 18 - Nível de expressão relativa dos genes <i>apx1</i> , <i>apx2</i> , <i>sod2</i> e <i>gst23</i> em folhas da variedade de milho p1-ww tratadas por 3, 6 e 12 horas com 0, 10, 100 ou 1000 $\mu$ M de ABA. ....	83
Figura 19 - Nível de expressão relativa dos genes $\gamma$ - <i>ecs</i> , <i>gsh-s</i> e <i>gsr1</i> em folhas da variedade de milho p1-ww tratadas por 3, 6 e 12 horas com 0, 10, 100 ou 1000 $\mu$ M de ABA.....	84
Figura 20 - Análise da produção de peróxido de hidrogênio, coloração por DAB, em folhas de plântulas de milho. DAB1, DAB2 e DAB3 ....	87
Figura 21 - Análise da produção de peróxido de hidrogênio, coloração em folhas de plântulas de milho por DAB. DAB4 e DAB5. ....	88

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de iniciadores e concentrações usadas para quantificação de transcritos em <i>Zea mays</i> por qRT-PCR.....	65
Tabela 2 – Concentrações definidas para cada par de iniciadores após titulação.....	70
Tabela 3 – Iniciadores testados, mas não incluídos nas análises de quantificação de transcritos.....	76
Tabela 4 – Valores de eficiência, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e temperatura de <i>melting</i> ( $T_m$ ) obtidos nas curvas de validação. <i>Tub</i> I – valores referentes a curva de validação realizada na primeira placa de PCR em tempo real; <i>tub</i> II – valores referentes a curva de validação realizada na segunda placa de PCR; <i>tub</i> III – valores referentes a curva de validação realizada na terceira placa de PCR; <i>tub</i> IV – valores referentes a curva de validação realizada na quarta placa de PCR; <i>tub</i> IV – valores referentes a curva de validação realizada na quarta placa de PCR.....	81



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABA - Ácido Abscísico  
APX – Ascorbato Peroxidase  
ATP – Adenosina Trifosfato  
CAT – Catalase  
cDNA – DNA complementar  
Ct – Ciclo Limiar (*Cycle Threshold*)  
DAB – Diaminobenzidina  
Δ - Delta  
DHAR – Dehidroascorbato Redutase  
DNA – Ácido Desoxirribonucleico  
FAD - Flavina-Adenina Dinucleotídeo  
GPX – Glutationa Peroxidase  
GR – Glutationa Redutase  
GSH – Glutationa (forma reduzida)  
GSSG – Glutationa (forma oxidada)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio  
IDP - Isopentenil  
MAPK – Proteína Kinase Mitógeno-Ativada  
MDHA – Monodehidroascorbato  
MDHAR – Monodehidroascorbato Redutase  
MEP – 2C-metil-D-eritrol-4 fosfato  
mRNA – RNA mensageiro  
NADP – Fostato de Nicotinamida-Adenina Dinucleotídeo  
NCEDs – *cis*-epoxicarotenoides dioxigenases  
NOX – NADPH Oxidases Vegetais  
qRT-PCR – Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa  
RBOHs – Homólogos da oxidase do *burst* respiratório  
RNA – Ácido Ribonucleico  
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio  
SOD - Superóxido Dismutase  
T<sub>m</sub> – Temperatura de *Melting* (dissociação)



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>27</b>
2.1 O MILHO: PLANTA MODELO C4 .....	27
2.2 VARIEDADE DE MILHO COM EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE FLAVONOIDES .....	30
2.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS).....	32
2.4 SISTEMAS ANTIOXIDANTES E SINALIZAÇÃO CELULAR.....	38
2.5 O ÁCIDO ABCÍSIICO .....	46
2.6 TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qRT-PCR).....	51
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	57
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>61</b>
4.1 PLANTAS E TRATAMENTOS .....	61
4.2 ISOLAMENTO DO RNA E SÍNTESE DE cDNA .....	62
4.3 DESENHO DOS INICIADORES PARA qRT-PCR .....	63
4.4 TITULAÇÃO DE INICIADORES PARA qRT-PCR .....	63
4.5 SELEÇÃO DE GENE DE REFERÊNCIA PARA qRT-PCR .....	63
4.6 VALIDAÇÃO DE GENES PARA qRT-PCR .....	66
4.7 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE TRANSCRITOS POR qRT-PCR ...	66
4.8 CONDIÇÕES DE qRT-PCR .....	66
4.9 DESENHO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	67
4.10 DETECÇÃO HISTOQUÍMICA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM FOLHAS DE PLÂNTULAS DE MILHO .....	67
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>69</b>
5.1 TITULAÇÃO DOS INICIADORES PARA qRT-PCR.....	69
5.2 SELEÇÃO DE GENE DE REFERÊNCIA PARA AS ANÁLISES DE qRT- PCR .....	73

5.3 VALIDAÇÃO DO EXPERIMENTO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS POR qRT-PCR .....	74
5.5 DETECÇÃO HISTOQUÍMICA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO .....	86
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
6.1 EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA ANTIOXIDANTE EM PLÂNTULAS DE MILHO POR qRT-PCR .....	89
6.2 DETECÇÃO HISTOQUÍMICA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM PLÂNTULAS DE MILHO USANDO DAB.....	98
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>101</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) possui importância como cultura em virtude de representar uma abundante fonte de alimentação humana e animal, por estar presente em muitos produtos industriais e por ser uma importante fonte de etanol. Além disso, por mais de um século, tem sido considerado organismo modelo pioneiro para a realização de pesquisas científicas na área biológica (Lawrence *et al.*, 2008).

A evolução de processos metabólicos aeróbicos em plantas superiores, tais como a respiração e a fotossíntese, inevitavelmente levou à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (Apel e Hirt, 2004). As ROS são produzidas sob certas condições fisiológicas e, sendo moléculas altamente reativas, podem causar distúrbios em membranas e outros componentes celulares. Nesse sentido, é importante remover o excesso dessas moléculas das células e prevenir injúrias produzidas pelo estresse oxidativo (Ahmad *et al.*, 2012). Assim, as propriedades citotóxicas das ROS explicam a evolução de complexos arranjos de mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos de detoxificação em plantas (Apel e Hirt, 2004).

Os antioxidantes enzimáticos incluem superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), guaiacol-peroxidase, enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, tais como monodeidroascorbato redutase, deidroascorbato redutase e glutaciona redutase (GR). Ascorbato, glutaciona, carotenoides, tocoferóis, e fenólicos servem como potentes antioxidantes não-enzimáticos dentro da célula (Sharma *et al.*, 2012). Os flavonoides são compostos importantes no sistema antioxidante secundário de células de plantas superiores uma vez que, em condições de estresse severo, as quais acarretam diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, ocorre indução da biossíntese de flavonoides (Agati *et al.*, 2012).

Sob condições de estresse biótico e abiótico, a superprodução de ROS pode superar o sistema antioxidante, resultando em dano oxidativo a lipídios, açúcares, proteínas e ácidos nucleicos. Em alguns casos extremos pode levar à morte celular. Porém, não se pode deixar de mencionar o fato de as ROS também terem funções como reguladores-chave de muitos processos biológicos, tais como crescimento, ciclo celular, morte celular programada e desenvolvimento da planta (Ahmad *et al.*, 2012).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é uma ROS que não carrega carga, sendo relativamente estável em solução. Podendo ser difundida

através de membranas biológicas, torna-se uma molécula apta a servir para funções de sinalização celular. Normalmente, a geração dessa ROS é mantida a níveis basais em células saudáveis, porém, tais níveis podem ser aumentados em resposta ao estresse (Ahmad *et al.*, 2012).

O hormônio ácido abscísico (ABA) desempenha importantes papéis em muitos processos celulares incluindo desenvolvimento da semente, dormência, germinação, crescimento vegetativo e respostas a estresses ambientais. Essas funções tão diversas envolvem complexos mecanismos regulatórios que controlam sua produção, degradação, percepção e transdução de sinal. Em meio a tantas funções, pode-se dizer que o ABA possui papel-chave nas respostas das plantas a estresses (Xiong e Zhu, 2003).

O ABA possui relação com o estresse oxidativo em células vegetais, sendo as ROS importantes componentes intermediários na indução do sistema antioxidante de plantas pelo ABA (Zhang *et al.*, 2006). Nesse sentido, tem sido reportados estudos em que o ABA induz a geração de  $H_2O_2$  e provoca um acionamento no sistema antioxidante vegetal. Em plântulas de milho, por exemplo, após tratamento com ABA, foi verificada maior produção de  $H_2O_2$ , acarretando em aumento nos níveis enzimáticos e/ou aumentos na expressão de genes do sistema antioxidante, verificadas através de ensaios enzimáticos e PCR semi-quantitativa (Hu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006).

O presente estudo buscou avaliar a resposta do tecido fotossintético de milho ao ABA em relação a produção de ROS e ao sistema antioxidante de uma variedade de milho que possui baixo teor de flavonoides, através do uso da PCR quantitativa, método pouco aplicado em estudos de expressão de genes do sistema antioxidante em resposta ao tratamento com ABA em milho.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O MILHO: PLANTA MODELO C4

Planta pertencente à família das gramíneas (Poaceae), o milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais importantes cultivados globalmente. Sua importância se dá em função não apenas devido ao fato de ser fonte de nutrientes para a nutrição humana e fonte de alimento para animais, mas também por estar presente em vários produtos industrializados. O milho pode ser encontrado no mundo todo, principalmente devido ao seu fácil processamento e digestibilidade e baixos custos se comparado com outros cereais. Ainda, o milho 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).

O Brasil é considerado um dos grandes produtores de milho. Segundo relatório disponibilizado pela Companhia Nacional de Abastecimento, o Brasil obteve na safra 2010/11, aproximadamente 57,4 milhões de toneladas de milho e na safra 2011/12, um recorde de aproximados 72,73 milhões de toneladas, sendo as estimativas para a próxima safra de que sejam mantidos valores em torno dessa grandeza (Conab, 2012).

Além do alto valor como *commodity*, o milho tem sido considerado uma planta-modelo pioneira para realização de pesquisas biológicas há mais de 100 anos. Muitas descobertas científicas foram primeiramente demonstradas em milho como, por exemplo, a paramutação um importante fenômeno da epigenética (Coe, 1966; Lawrence *et al.*, 2008). Gerações de geneticistas têm recorrido ao milho para estudar suas questões básicas, fenômenos curiosos e aplicações práticas (Coe, 2001). Assim, o milho serve ao mesmo tempo como *commodity* e como planta-modelo para a pesquisa científica básica (Lawrence *et al.*, 2008).

De acordo com o padrão fotossintético, as plantas podem ser caracterizadas em três categorias: plantas que possuem um ciclo de três carbonos (plantas C3), plantas com ciclo de quatro carbonos (plantas C4) e alternativamente, a fixação do carbono pode ocorrer por meio do Metabolismo Ácido das Crassuláceas (plantas CAM) (Ehleringer; Cerling; Helliker, 1997). O ciclo fotossintético C4 possui uma particularidade adicional se comparado à via C3, permitindo a adaptação de plantas a altas intensidades luminosas, altas temperaturas e condições secas. Sendo assim, as plantas C4 dominam ambientes de pastagem e

têm grande participação na produção de biomassa nos climas mais quentes das regiões tropicais e subtropicais (Gowik e Westhoff, 2011).

Quando o processo fotossintético teve início, a atmosfera terrestre contava com grande concentração de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e baixas taxas de oxigênio ( $\text{O}_2$ ). Nesse ambiente, a rota C3, também chamada de ciclo de Calvin-Benson, realizava a fixação do  $\text{CO}_2$  com grande eficiência. Porém, com o passar dos séculos, as concentrações atmosféricas de  $\text{CO}_2$  diminuíram ao passo que as taxas de  $\text{O}_2$  aumentaram. Assim, como parte do processo evolutivo, houve necessidade de inovações biológicas no sentido de aumentar a eficiência fotossintética nos diferentes ambientes. Entre as inovações, pode-se citar a rota fotossintética C4, a qual não altera a maquinaria fundamental do ciclo de Calvin-Benson, apenas representa modificações estruturais e bioquímicas em tal rota a fim de melhorar seu desempenho. Se por um lado a rota C4 envolve mudanças relativamente pequenas no padrão básico C3, por outro, fornece vantagens significativas às plantas que realizam esse processo em comparação com aquelas que realizam apenas a rota C3 (Tipple e Pagani, 2007).

A fixação do  $\text{CO}_2$  nas plantas C4 ocorre em duas etapas. A primeira consiste na fixação do  $\text{CO}_2$  atmosférico no citosol das células do mesófilo pela fosfoenolpiruvato carboxilase para formar o composto de quatro carbonos oxaloacetato, que posteriormente é convertido em malato ou aspartato, que são difundidos para o anel interno de células da bainha vascular, onde são descarboxilados nos cloroplastos. O  $\text{CO}_2$  produzido é então refixado pela Rubisco. Essa compartimentalização das atividades fotossintéticas em dois tipos especializados de células e de cloroplastos é característica chave da fotossíntese em plantas C4 (Figura 1). Se por um lado, as plantas C3 possuem as células do anel interno da bainha vascular, onde se encontra a Rubisco e onde ocorrem as reações fotossintéticas, separadas das células do mesófilo por uma lamela altamente resistente à difusão do  $\text{CO}_2$ , por outro, as C4, anatomicamente diferenciadas, têm células do mesófilo atuando como bombas de  $\text{CO}_2$ , que aumentam a concentração desse gás nas células da bainha vascular em até dez vezes mais que as concentrações atmosféricas, otimizando a eficiência fotossintética (Furbank e Taylor, 1995), inibindo a ocorrência de fotorrespiração e promovendo uma nova fixação do  $\text{CO}_2$  (Kennedy, 1976).

As plantas C3 possuem apenas um tipo de cloroplasto, que realiza todas as reações que convertem a energia luminosa em energia química, usada para fixar o  $\text{CO}_2$  e sintetizar os compostos de carbono necessários à vida. Já a rota C4 da fotossíntese consiste numa adaptação da rota C3,

sendo que, nessas plantas, a fotorrespiração ocorre em taxas muito reduzidas ou não ocorre. Além disso, as plantas C4 possuem outras características que as distinguem das C3, como por exemplo, cloroplasto de estrutura diferente, temperatura ótima para a fotossíntese mais alta, maior ponto de saturação luminosa e baixas taxas de transpiração (Kennedy, 1976; Furbank e Taylor, 1995).

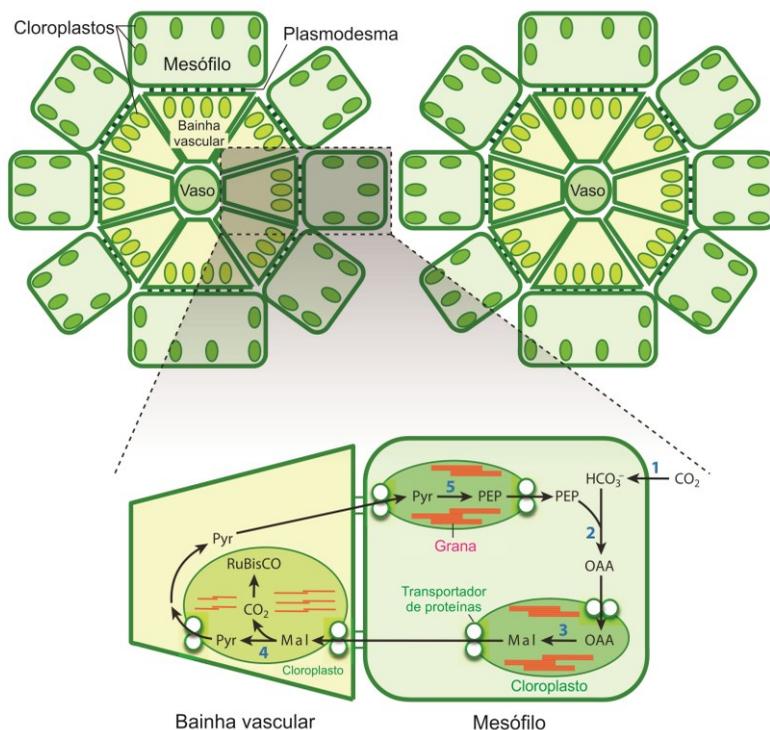


Figura 1 – Esquema da fotossíntese em plantas C4. Oxaloacetato (OAA), fosfoenolpiruvato (PEP), malato (Mal), piruvato, (Pyr). Adaptado de Hibberd e Covshoff, 2010.

Com ampla vascularização, as folhas de plantas C4 possuem um anel de células da bainha vascular rodeadas por um segundo anel de células do mesófilo. Tal disposição celular, a chamada anatomia Kranz, somada à compartimentalização enzimática, são características importantes da fotossíntese em plantas C4. As células da bainha vascular, sempre em contato com os vasos condutores, têm paredes celulares grossas e plastídios arranjados centripetamente,

centrifugamente ou aleatoriamente na célula, conforme a espécie. No caso do milho, as células da bainha vascular possuem cloroplastos localizados centrifugamente. Contrariamente, as células do mesófilo, que não fazem contato com os vasos condutores, têm paredes celulares finas e cloroplastos menores aleatoriamente distribuídos (Nelson e Langdale, 1992).

As plantas C4 têm dois tipos distintos de cloroplastos, sendo cada qual encontrado em um tipo celular especializado. O milho, durante a fase de desenvolvimento inicial, possui cloroplastos das células do mesófilo e da bainha vascular morfológicamente similares, contendo pilhas de grana. Porém, após a desdiferenciação, em folhas maduras, os cloroplastos das células da bainha vascular se tornam agranais. Outra diferença entre os cloroplastos encontrados em cada tipo celular reside no fato de as células da bainha vascular possuírem plastídeos capazes de acumular amido, enquanto que as células do mesófilo possuem cloroplastos que não acumulam amido (Nelson e Langdale, 1992).

## 2.2 VARIEDADE DE MILHO COM EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE FLAVONOIDES

Metabólitos secundários amplamente difundidos no reino vegetal, os flavonoides, desempenham funções em muitos aspectos da biologia das plantas, incluindo pigmentação, viabilidade do pólen, interação da planta com microorganismos e proteção contra radiação ultravioleta. Além disso, possuem ação na detoxificação de radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (ROS), e ainda propriedades de quelantes de metais (Grotewold *et al.*, 1998; Pourcel *et al.*, 2007). Os flavonoides podem diretamente detoxificar o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, estando localizados nos vacúolos das células vegetais (Karuppanapandian *et al.*, 2011).

Quanto às funções antioxidantes dos flavonoides, sugere-se que constituem um sistema antioxidante secundário, o qual é ativado em consequência da diminuição da atividade enzimática antioxidante. Assim, condições de estresse muito severo, por exemplo, luz excessiva concomitante a outro estresse, deve inativar enzimas antioxidantes, enquanto ocorre a indução da biossíntese de flavonoides. É interessante notar que a biossíntese desses compostos é mais intensa em espécies sensíveis ao estresse se comparada às tolerantes. Isso porque espécies sensíveis ao estresse mostram uma primeira linha de defesa menos

efetiva contra ROS e são subsequentemente acometidas por estresse oxidativo mais severo (Agati *et al.*, 2012).

O milho possui duas grandes classes de flavonoides: 3-hidróxi e 3-deóxi flavonoides, ambos derivados de um intermediário comum, a flavanona. Os 3-hidróxi flavonoides e seus pigmentos derivados, as antocianinas, podem ser encontrados em quase todos os órgãos da planta, desde que presentes seus reguladores adequados. Em contraste, os 3-deóxi flavonoides do milho são apenas encontrados em certos órgãos florais, incluindo o pericarpo, glumas da espiga e do pendão, estigmas e palha. Em pericarpos maduros e glumas da espiga, os 3-deóxi flavonoides polimerizam para formar os pigmentos vermelhos flobafenos (Grotewold; Bowen; Peterson, 1994).

O fenômeno da paramutação consiste numa interação entre alelos que acarreta em mudanças herdáveis, mitóticas e meióticas, na expressão gênica. O termo foi descrito em 4 genes de milho envolvidos na rota de biossíntese de flavonoides, sendo um deles o gene P1 (cor do pericarpo, ou *pericarp color1*, em inglês). O gene P1 é necessário para a biossíntese dos 3-deóxi flavonoides e flobafenos no pericarpo e nas partes florais da espiga. O pericarpo, sendo um remanescente da parede do ovário é, portanto, tecido materno. As partes florais pigmentadas incluem as glumas, lema e pálea, as quais circundam o ovário e fazem a palha da espiga madura. A pigmentação diferencial do pericarpo (parte mais externa da semente) e das glumas do sabugo (brácteas modificadas das flores que envolvem cada semente, *kernel*) distinguem muitos alelos P1 de ocorrência natural. De acordo com o padrão de pigmentação no pericarpo da semente e nas glumas do sabugo, os alelos P1 são comumente classificados em 4 grandes tipos. Os alelos P1 são comumente identificados por um sufixo de 2 letras, o qual descreve sua expressão no pericarpo e no sabugo. Assim, P1-rr especifica pericarpo e sabugo vermelhos, p1-ww especifica pericarpo e sabugo brancos (ou melhor, sem cor), P1-wr especifica pericarpo branco (sem cor) e sabugo vermelho e P1-rw, pericarpo vermelho e sabugo branco (figura 2). Em heterozigotos, coloração no pericarpo e sabugo é dominante em relação à ausência de cor. O alelo P1 que sofre paramutação é o P1-rr. O gene P1 de milho localiza-se no braço curto do cromossomo 1 e codifica um fator de transcrição Myb que controla os genes estruturais da rota de biossíntese dos flobafenos. Assim, o produto do gene P1 regula a biossíntese do pigmento vermelho flobafeno que se encontra no pericarpo maduro e nas glumas do sabugo. O alelo P1-rr possui alta expressão P1, que expressa Myb e acumula flavonoides. Já o alelo p1-ww possui uma inserção de transposon no gene P1 e produz menos

flavonoide (Chandler; Stam; Sidorenko, 2002; Grotewold; Bowen; Peterson, 1994; Goettel e Messing, 2009; Peterson, 1990; Sidorenko e Chandler, 2008; Zhang e Peterson, 2006).

O gene P1 provavelmente foi originado de um evento de duplicação ocorrido a aproximadamente 2,75 milhões de anos atrás, a partir de um gene ancestral, o qual está intimamente relacionado com o gene P2 do teosinto. O gene P2 em milho não participa da indução da síntese de flobafenos, mas em teosinto, o gene confere pigmentação às margens das glumas do pendão (Goettel e Messing, 2009).

As variedades p1-ww e P1-rr se tornam interessantes no estudo da expressão gênica e estresse oxidativo por apresentarem níveis diferenciais de flobafenos.

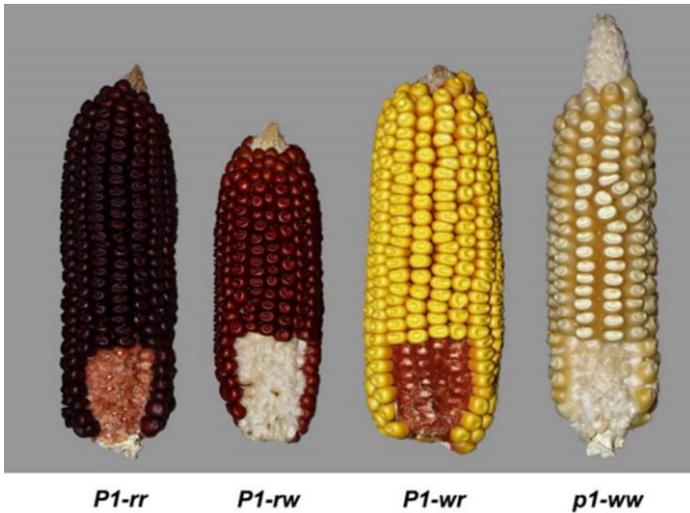


Figura 2 - Fenótipo das espigas das variedades de milho P1-rr, P1-rw, P1-wr e p1-ww. P1-rr (pericarpo e sabugos roxos), P1-rw (pericarpo roxo e e sabugo branco), P1-wr (pericarpo branco e sabugo roxo) e p1-ww (pericarpo e sabugo brancos, ou sem cor). (Goettel e Messing, 2009).

### 2.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

A evolução de organismos aeróbicos que passaram a usar oxigênio (O<sub>2</sub>) como o receptor final de elétrons, possibilitado a partir do acúmulo desse gás na atmosfera terrestre, permitiu que tais seres obtivessem mais energia, comparados aos que realizavam fermentação e respiração anaeróbica. Assim, a quebra completa de uma molécula de

glicose passou a formar trinta e oito ATPs, ao passo que a quebra anaeróbica dessa mesma molécula de glicose em etanol e monóxido de carbono formava apenas oito ATPs (Scandalios, 1993).

A vida sob condições aeróbias está intimamente relacionada à produção de ROS. Em plantas, durante o processo da fotossíntese e respiração, ocorre contínua produção de tais espécies como subprodutos do metabolismo aeróbico dos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. Existem diferentes tipos de ROS, as quais têm em comum a característica de causar dano oxidativo a proteínas, DNA e lipídios. Contudo, as plantas desenvolveram, evolutivamente, mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para efetuar a detoxificação de tais substâncias potencialmente danosas (Apel e Hirt, 2004; Van Breusegem e Dat, 2006).

O  $O_2$  em seu estado molecular (dioxigênio) é relativamente estável, porém pode dar origem a estados intermediários excitados reativos, como radicais livres e seus derivados, durante os passos do processo da sua redução à água. As espécies reativas do oxigênio reduzido incluem o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila. Estas, somadas ao fisiologicamente energizado oxigênio singlete, são as espécies biologicamente mais importantes de oxigênio (Apel e Hirt, 2004; Sharma *et al.*, 2012).

Todas as ROS são extremamente reativas e citotóxicas a todos os organismos. Elas podem reagir com ácidos graxos insaturados e provocar a peroxidação de membranas lipídicas essenciais da membrana plasmática ou de organelas intracelulares. O dano da peroxidação na membrana plasmática leva ao escoamento dos conteúdos celulares, à rápida dessecação e à morte celular. Por sua vez, o dano em membranas intracelulares pode afetar a atividade respiratória da mitocôndria, causando quebra de pigmentos, e induzir a perda da habilidade de fixação de carbono dos cloroplastos. Muitas enzimas do Ciclo de Calvin presentes no cloroplasto são extremamente sensíveis ao  $H_2O_2$ , e altos níveis dessa substância, que é o produto da dismutação de dois ânions superóxido, inibem a fixação de  $CO_2$  de forma direta. Superóxido e  $H_2O_2$  podem reagir e formar radical hidroxila, o mais potente oxidante conhecido, pois ataca indiscriminadamente e rapidamente todas as macromoléculas, danificando seriamente os componentes celulares e o DNA, e ainda, frequentemente provoca disfunção metabólica irreversível e morte celular (Scandalios, 1993).

Sendo assim, pode-se afirmar que, se por um lado o  $O_2$  é essencial para a existência e sobrevivência de organismos aeróbios, por outro, ele pode provocar mudanças fisiológicas, representadas pelo

estresse oxidativo (Scandalios, 1993). O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes de um organismo (Ahmad; Sarwat; Sharma, 2008). Plantas tendem a ser afetadas por essas mudanças mais do que os outros eucariotos por dois motivos. Primeiro, porque são sésseis e assim estão sujeitas às alterações ambientais e segundo, pois as plantas, além de consumirem  $O_2$  durante a respiração, produzem-no na fotossíntese, possuindo concentrações celulares de  $O_2$  maiores que quaisquer outros organismos (Scandalios, 1993).

Em plantas, de maneira geral, quando existem altas taxas de NADPH/NADP, o radical superóxido e o oxigênio singlete são produzidos em cloroplastos expostos à luz em função da transferência ocasional de um elétron de uma molécula de clorofila excitada ou de componentes do Fotossistema I para o oxigênio molecular. Componentes essenciais das membranas tilacóides, os carotenoides, podem extinguir o estado excitado da clorofila e do oxigênio singlete. Porém, muitos tipos de perturbações ambientais, tais como luz intensa, seca, herbicidas ou temperaturas extremas podem causar o excesso de produção de ROS, acarretando em sobrecarga no sistema, que poderá exigir defesas adicionais. Um exemplo a ser citado é caso de estresse hídrico, quando o estômato se fecha para evitar a perda de água, porém, isso também resulta em limitação na disponibilidade de  $CO_2$  para a assimilação fotossintética do carbono. Sob tais condições, acrescida de luz solar intensa, o excesso de produção de superóxido no cloroplasto pode resultar em danos de foto-inibição e foto-oxidação (Scandalios, 1993).

As ROS não são apenas produzidas como bioprodutos dos processos celulares, mas também deliberadamente formadas por complexos enzimáticos, os quais compreendem as peroxidases classe III, oxalato oxidases, amino oxidases, lipoxigenases, quinona redutases e NADPH oxidases vegetais (NOXs), que são as enzimas produtoras de ROS mais estudadas. As NOXs de plantas são conhecidas como homólogos da oxidase do *burst* respiratório (em inglês, *respiratory burst oxidase homologues* RBOHs), sendo homólogas à subunidade catalítica da NOX de fagócitos de mamíferos. As RBOHs são proteínas integrais da membrana plasmática compostas por 6 domínios transmembrana que possuem dois grupos heme, C-terminal FAD e NADPH hidrofílico, e dois domínios de ligação de cálcio N-terminal. NADPH age como um doador de elétron citosólico ao receptor de elétron extracelular  $O_2$ , o qual é reduzido a radical superóxido via FAD e dois grupos heme independentes. Os genes RBOH pertencem a uma pequena família

multigênica, que possui, por exemplo, 10 membros em *Arabidopsis*, compostas por 5 grupos de sequências ortólogas (Marino *et al.*, 2012).

O  $H_2O_2$ , uma das mais abundantes ROS em organismos aeróbicos, é continuamente produzido como produto do metabolismo aeróbico na mitocôndria e da fotossíntese nos cloroplastos (Bienert; Schjoerring; Jahn, 2006). A rota do  $H_2O_2$  na célula pode ser observada na figura 3. Plantas que realizam fotorrespiração também têm geração de  $H_2O_2$  nos peroxissomos, além da produção nos cloroplastos e mitocôndrias. Os peroxissomos possuem também outros sistemas de geração de tal composto. O  $H_2O_2$  difunde-se livremente através da célula e os níveis celulares são determinados por taxas de produção e metabolismo via CAT e também pela atividade do ciclo ascorbato/glutationa. Além disso, o  $H_2O_2$  também reage com GSH para convertê-la de seu estado reduzido para oxidado (Neill; Desikan; Hancock, 2002).

Apesar de o  $H_2O_2$  possuir potencial para danificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, sua imagem como uma ameaça à homeostase celular tem sido questionada, pois se descobriu que o  $H_2O_2$  é indispensável para uma larga variedade de caminhos metabólicos, podendo ser então, além de potencialmente tóxico, um composto central quando se trata de sinalização. Nesse caso, vale lembrar que as concentrações deste composto multifatorial devem ser rigorosamente controladas na célula (Bienert; Schjoerring; Jahn, 2006).

Estudos afirmam que estresses abióticos, tais como desidratação, temperaturas extremamente altas ou baixas, bem como radiação excessiva, podem provocar desequilíbrio entre produção de  $H_2O_2$  e defesas antioxidantes. Ao mesmo tempo, esse aumento de produção de tal ROS inicia a resposta de sinalização, que inclui ativação de enzimas, expressão gênica, morte celular programada e dano celular. O  $H_2O_2$  também pode ser gerado por enzimas específicas, nesse caso, ocorre um *burst* oxidativo com síntese rápida desse composto e posterior liberação no apoplasto em função de resposta a patógenos, ferimentos, luz ultravioleta e ozônio. Uma dessas enzimas que atuam na regulação de  $H_2O_2$  é a NADPH oxidase, cuja atividade é modulada diretamente por cálcio, outras a ser citadas são as Rho-like small G proteins (Rops), bem como a xantina oxidase, amino oxidase e uma peroxidase de parede celular (Neill; Desikan; Hancock, 2002).

Em circunstâncias normais, os sistemas celulares antioxidantes removem o  $H_2O_2$  eficientemente. No entanto, quando quantidades muito grandes de  $H_2O_2$  são produzidas, qualquer redução na atividade antioxidante, acarretará em efeitos potencialmente desastrosos. Importa

notar que nem sempre o efeito oxidativo será acarretado pelo aumento na produção de  $H_2O_2$ , mas pode ocorrer também em função de redução da atividade das enzimas antioxidantes. Possivelmente, quando a célula exibe grande poder antioxidante, ocorre uma dificuldade no deslocamento do  $H_2O_2$  a longa distância dentro da célula. Assim, as respostas ao  $H_2O_2$  devem ser localizadas em micro domínios celulares. Além disso, o local onde ocorreu o aumento de síntese de tal ROS também exerce influência sobre um possível dano. Nesse sentido, mesmo quando ocorre um aumento relativo de  $H_2O_2$  no apoplasto, que contém pequena proporção de capacidade antioxidante, esse excesso é rapidamente movido para dentro da célula e então metabolizado (Neill; Desikan; Hancock, 2002).

Acredita-se que o transporte do  $H_2O_2$  ocorre por difusão facilitada através das bicamadas lipídicas. Entretanto, muitos sistemas de membranas têm se mostrado menos permeáveis ao  $H_2O_2$ , o que leva a crer que a difusão possa ser controlada por alterações na composição das membranas. Por outro lado, proteínas de canal podem facilitar a difusão de tal composto (Bienert; Schjoerring; Jahn, 2006).

Entre os processos biológicos mediados pelo  $H_2O_2$ , inclui-se o fechamento dos estômatos, também mediado pelo Ácido Abscísico, o gravitropismo radicular, em conjunto com a auxina, além da já referenciada morte celular programada, a qual é dirigida por vários sinais, incluindo a interação entre o  $H_2O_2$  e o óxido nítrico. Estudos apontam para a participação da mitocôndria no mecanismo pelo qual o  $H_2O_2$  atua na morte celular (Neill; Desikan; Hancock, 2002).

O  $H_2O_2$  é uma das mais estáveis ROS em plantas e regula processos básicos tais como aclimação, defesa e desenvolvimento celular, sendo uma ROS não formada por radical e uma molécula que não carrega carga líquida. Devido a sua relativa estabilidade e capacidade de se difundir através de membranas, é considerado uma molécula sinalizadora de grandes distâncias, podendo atuar como segundo mensageiro provocando fluxos de cálcio, translocação de proteínas e expressão de genes. O  $H_2O_2$  pode induzir, ainda, a síntese ou a ativação de vários fatores de transcrição, os quais estão associados com a indução de enzimas antioxidantes. É possível afirmar também que a geração de ROS aumenta devido à imposição de estresse a plantas e a produção de  $H_2O_2$  pode ser considerada um fator chave mediador do fenômeno de aclimação e tolerância cruzada. Por exemplo, foi demonstrado que tratamento com  $H_2O_2$  aumentou a resistência à seca, ao calor, frio, e estresse salino em plântulas de milho (Gondim *et al.*, 2010).

Uma vez que os íons de  $\text{H}_2\text{O}_2$  são reduzidos pelo superóxido em radical hidroxila em presença de metais de transição e que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o superóxido são muito menos reativos que o radical hidroxila, potencialmente danoso, somado ao fato de não haver meios conhecidos de a célula eliminar tais radicais, o único meio de evitar a oxidação provocada por tal substância é controlar a reação que leva a sua geração. Então, a célula necessita fazer uso de sofisticadas estratégias para manter as concentrações de superóxido,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e metais de transição, tais como ferro e cobre, sob controle (Apel e Hirt, 2004).

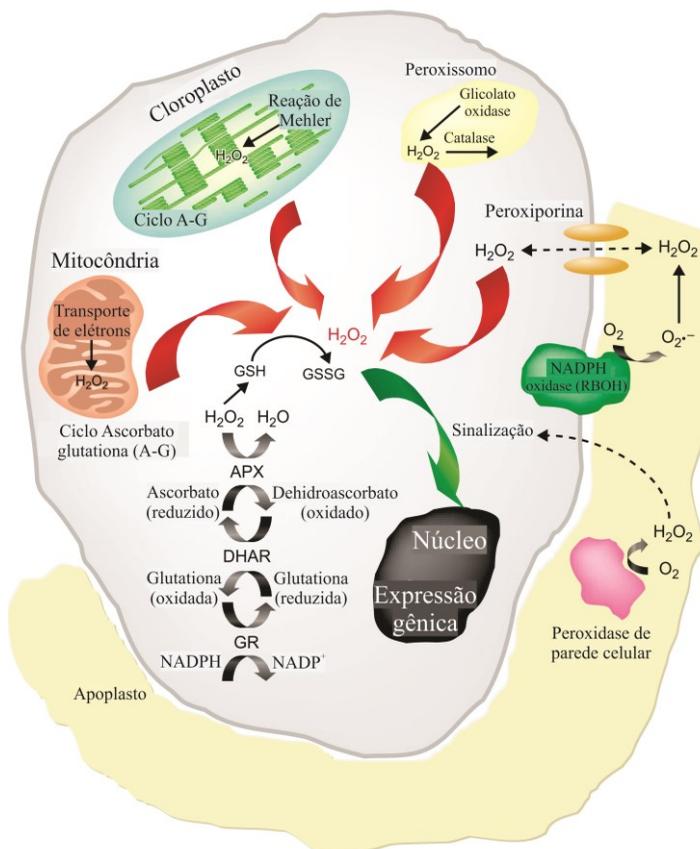


Figura 3 – Movimento do peróxido de hidrogênio na célula vegetal. Ascorbato peroxidase (APX), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutatona redutase (GR). Adaptado de Neill; Desikan; Hancock, 2002.

## 2.4 SISTEMAS ANTIOXIDANTES E SINALIZAÇÃO CELULAR

Meios enzimáticos de detoxificação celular de ROS incluem superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPX) e catalase (CAT) (Apel e Hirt, 2004).

As SODs são metaloproteínas onipresentes em organismos que vivem na presença de oxigênio, que catalisam a dismutação de radicais livres superóxidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, de acordo com a reação  $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ . Embora codificados pelo genoma nuclear, os genes das SODs são expressos em diferentes níveis em diferentes tecidos, estando os produtos dos genes localizados no citosol e em organelas subcelulares (Giannopolitis e Ries, 1977; Cannon; White; Scandalios, 1987; McCord e Fridovich, 1969; Pilon; Ravet; Tapken; 2011). A reação completa da dismutação dos ânions superóxidos requer a participação de dois íons metálicos, os quais atuam como cofatores para a efetiva catálise. Quatro tipos de SODs foram descritas na literatura, conforme os metais que participam como cofatores na reação enzimática: FeSOD, que utiliza Ferro como cofator, sendo mais frequentemente encontrada na forma ativa em plastídeos ou no citosol; MnSOD, que utiliza como cofator o manganês, ocorrendo nas mitocôndrias dos eucariotos mas não em cloroplastos de plantas superiores; CuZnSOD, a qual utiliza como cofatores cobre e zinco e ocorre no citosol de eucariotos e em plantas também nos peroxissomos e plastídeos; NiSOD, a qual usa o níquel como cofator porém não ocorre em plantas (Pilon; Ravet; Tapken; 2011). Em milho existem 9 isozimas SODs, sendo 4 delas encontradas no citosol e que usam cobre e zinco como cofatores, sendo a SOD2 uma delas (Guan e Scandalios, 1998b). Dentro das células, as SODs constituem a primeira linha de defesa contra as ROS, assim, nos compartimentos celulares nos quais o radical superóxido pode ser produzido como subproduto da cadeia transportadora de elétrons, também podem ser encontradas as SODs (Alscher; Erturk; Heath, 2002).

Primeiras enzimas antioxidantes a serem descobertas e caracterizadas, as catalases se distinguem das outras enzimas por não necessitarem de um redutor ao realizarem reações de dismutação. Além disso, juntamente com as APX, as catalases são diferenciadas das muitas outras enzimas metabolizadoras de peróxido em função da sua alta especificidade pelo  $H_2O_2$ , porém fraca atividade contra peróxidos orgânicos. Sendo enzimas altamente expressas especialmente em certos tipos celulares, constituem-se em parte integrante do sistema antioxidante vegetal. As catalases realizam a dismutação do  $H_2O_2$  em

oxigênio e água, segundo a reação:  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ . Nessa classe enzimática estão incluídas as clássicas enzimas ferro heme, que constituem a maioria das catalases, um pequeno grupo de enzimas de manganês, além das ditas catalases-peroxidases, enzimas heme que realizam reações características de catalases e peroxidases. As catalases heme-dependentes são organizadas em tetrâmeros, sendo que cada monômero carrega um grupo prostético heme (Mhamdi *et al.*, 2010; Nicholls, 2012).

De acordo com classificação proposta por Willekens *et al.*, (1995), as catalases de plantas podem ser classificadas em 3 classes. A classe I compreende enzimas altamente expressas em folhas, de expressão dependente da luz, sendo mais proeminentes em células fotossintéticas, estando envolvidas na remoção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido durante a fotorrespiração. Uma enzima da classe I é a CAT2 do milho. As enzimas classe II estão mais expressas com tecidos vasculares, sendo a CAT3 do milho uma delas, e estando localizada na mitocôndria. Já a classe III é formada por catalases altamente abundantes em sementes e plântulas jovens, porém quase ausentes em estágios avançados de desenvolvimento, a CAT1 do milho é uma delas.

O gene *cat3*, que codifica a proteína CAT3 em milho, sofre influência do ritmo circadiano, apresentando pico de expressão na transição entre os períodos de dia/noite. Essa característica é oposta à da maioria dos genes envolvidos no metabolismo fotossintético, os quais possuem pico de expressão na transição noite/dia, como por exemplo, os genes *cat1* e *cat2* que codificam respectivamente as enzimas CAT1 e CAT2 de milho (Redinbaugh; Sabre; Scandalios, 1990).

Um importante ciclo no sistema de remoção das ROS nos cloroplastos é o chamado ciclo do ascorbato/glutationa (figura 4), no qual são empregadas quatro enzimas: APX, dehidroascorbato redutase, monodehidroascorbato redutase e glutaciona redutase (GR) (Foyer e Noctor, 2011; Resende; Salgado; Chaves, 2003). Em relação à APX, pode-se afirmar que desempenha importante papel no metabolismo do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em plantas superiores. Tal enzima utiliza o ascorbato como doador de elétrons para efetuar a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e monodehidroascorbato (MDHA), o qual pode novamente ser transformado em ascorbato em presença da monodehidroascorbato redutase, enzima dependente de NADPH (Shigeoka *et al.*, 2002). Após, há formação espontânea de dehidroascorbato a partir do MDHA, o qual pode ser reduzido a ascorbato pela dehidroascorbato redutase, na presença da glutaciona, que por sua vez, passa a sua forma oxidada (GSSG). Nesse momento, entra em cena a enzima GR, que vai fechar o



presente em concentrações que variam de 0,1 a 10 mM. A GSH constitui o tiol mais prevalente e o peptídeo de baixo peso molecular mais abundante na célula, representando mais de 90% do enxofre não proteico em muitas células (Meister, 1988). Sendo considerada essencial para o desenvolvimento normal da planta (Foyer; Theodoulou; Delrot, 2001), a GSH possui importância crucial na defesa celular, conferindo proteção a proteínas contra a desnaturação causada pela oxidação de grupos tióis proteicos durante o estresse, o que leva à formação de glutatona dissulfeto (GSSH). As formas oxidada e reduzida da glutatona coexistem na célula de forma intercambiável (Noctor *et al.*, 1998; Noctor e Foyer, 1998; Noctor *et al.*, 2002).

A biossíntese da GSH está bem estabelecida por meio de duas reações dependentes de ATP, o qual é desfosforilado à ADP no processo, conforme a figura 5. Primeiramente, a partir de uma ligação peptídica entre L-glutamato e L-cisteína, ocorre a formação de  $\gamma$ -glutamilcisteína, reação catalisada por  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase ( $\gamma$ -ECS). Em seguida, ocorre adição de um aminoácido glicina ao carbono terminal da  $\gamma$ -glutamilcisteína, reação catalisada pela glutatona sintetase (GS), que leva à formação da GSH. A GSH pode ser sintetizada no citosol ou no cloroplasto, uma vez que as enzimas catalisadoras de ambas as reações de síntese podem ser encontradas tanto em tecidos fotossintéticos quanto não fotossintéticos. A superexpressão de  $\gamma$ -ECS nestes sítios eleva em três vezes a concentração foliar de GSH, o que comprova o fato de a síntese ocorrer nestes locais (Noctor *et al.*, 1998). A forte influência inibitória que a GSH exerce sobre a primeira enzima,  $\gamma$ -ECS, age como um controle de *feedback* efetivo no sentido de regular a síntese do tripeptídeo (Beutler, 1989). A regulação da síntese de GSH também ocorre pela disponibilidade de cisteína, controle transcricional da  $\gamma$ -ECS e regulação traducional da  $\gamma$ -ECS pela taxa de glutatona reduzida para oxidada (Foyer; Theodoulou; Delrot, 2001).

As concentrações de GSH nos cloroplastos variam de 1 a 4,5 mM, porém, há que se notar que a determinação apurada das concentrações de GSH nas organelas se torna complicada em função das trocas do tripeptídeo entre os compartimentos durante o processo de fracionamento aquoso, trazendo à tona a questão da existência de transportadores intracelulares de GSH. O transporte de GSH na membrana plasmática foi investigado em células de tabaco e protoplastos de feijão. Provavelmente a GSH no apoplasto é proveniente do citosol (Noctor e Foyer, 1998). Foi identificada uma família de proteínas CLT, as quais promovem o transporte de  $\gamma$ -glutamilcisteína e GSH orientado para o envelope do cloroplasto. Uma porção

significativa da GSH celular foi detectada no núcleo, sendo recrutada para tal compartimento no ciclo celular durante a mitose. Foram detectadas altas concentrações de GSH em mitocôndrias foliares, apesar de não haver evidências da síntese do tripeptídeo na organela. Sugere-se que pode haver proteínas reguladoras de poro operando no controle da concentração nuclear e mitocondrial de GSH, similarmente ao observado em animais. Em *Arabidopsis*, foram identificadas proteínas associadas à multi resistência a drogas (MRPs), que promovem o transporte de GSSG para o vacúolo, sendo relatado o acúmulo de GSSG em tal organela (Noctor *et al.*, 2011). Relewa notar que as concentrações de GSH em diferentes células e tecidos decorrem do equilíbrio entre síntese, degradação, uso e transporte a curta e a longa distância (Foyer; Theodoulou; Delrot, 2001).

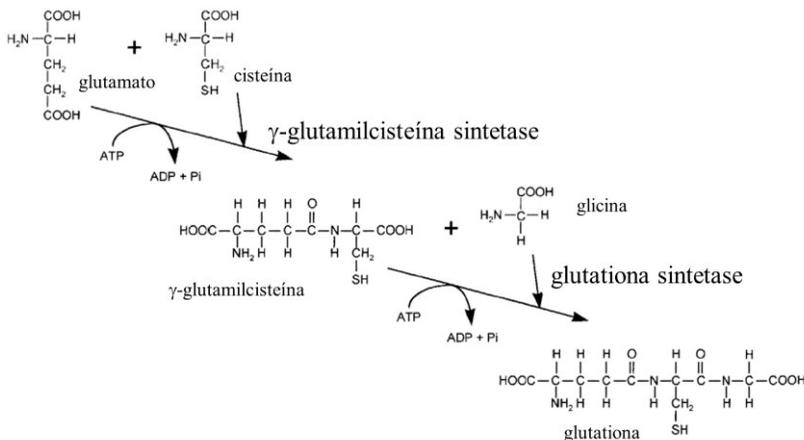


Figura 5 – Representação esquemática da rota da biossíntese da glutatona. Adaptado de Noctor *et al.*, 1998.

Quanto às funções antioxidantes, pode-se mencionar que a GSH reage quimicamente com várias ROS, promovendo a detoxificação por reações catalisadas por enzimas do  $\text{H}_2\text{O}_2$  no ciclo do ascorbato/glutatona. Além disso, protege proteínas contra a desnaturação, causada pela oxidação do grupo tiol proteico durante o estresse. Tais funções envolvem a oxidação do grupo tiol, principalmente para formar a GSSG. As taxas celulares de GSH:GSSG são mantidas pela GR, uma flavoproteína homodimérica que usa NADPH para promover a redução de GSSG para GSH. Os organismos aeróbicos, inclusive as plantas, mantêm o conteúdo tiol citoplasmático

no estado reduzido em função do baixo potencial redox dissulfeto devido a quantidades milimolares de GSH, que atua como tampão tiol. Cabe ressaltar que embora reações dissulfeto ocorram durante o ciclo catalítico de algumas enzimas, estas são geralmente transitórias. No entanto, ligações dissulfeto estáveis são relativamente raras, ocorrendo com frequência apenas em tecidos quiescentes, tais como sementes. A dupla redox GSH:GSSG pode ser considerada ideal para a transdução de informação já que soma as múltiplas funções da GSH dentro da célula com a estabilidade da GSSG, fazendo com que as taxas GSH:GSSG sejam mais influentes no controle da expressão gênica do que o tamanho absoluto do *pool* de GSH (Noctor; Vanacker; Foyer, 2001; Noctor *et al.*, 2002).

Além das funções antioxidantes, a GSH é o precursor de fitoquelatinas e o substrato para a ação das glutathione-S-transferases (GSTs) (Noctor *et al.*, 2002). As fitoquelatinas são cruciais no controle das concentrações de metais pesados na célula (Noctor e Foyer, 1998), enquanto que as GSTs possuem papel no metabolismo de compostos exógenos (xenobióticos) via conjugação da GSH a uma variedade de substratos hidrofóbicos, eletrofilicos e usualmente citotóxicos. A função primeiramente descoberta das GSTs consiste na anteriormente citada, porém, as GSTs possuem diversas funções em processos celulares, as quais possuem em comum o reconhecimento e o transporte de um amplo espectro de compostos, sejam eles de origem exógena ou endógena. Cabe ressaltar que se torna crucial para a sobrevivência do organismo a habilidade de transformar, metabolizar e eliminar os compostos nocivos de seus tecidos (Marrs, 1996), releva notar que as GSTs podem usar a GSH para reduzir peróxidos (Noctor *et al.*, 2002).

A GSH também pode atuar como doador direto de elétrons para peróxidos em reações catalisadas pela GPX, enzima que em plantas, ao contrário dos animais, não é constitutiva, mas induzida pelo estresse. Em plantas, a geração de peróxido de hidrogênio é muito alta e a reação de redução desta ROS é catalisada a taxas muito baixas dependentemente da GSH, diferentemente dos animais, nos quais a detoxificação do peróxido de hidrogênio ocorre a altas taxas. Nas plantas, as GPXs possuem importância na remoção de lipídios e peróxidos de alquila, enquanto a detoxificação de peróxido de hidrogênio se deve predominantemente à ação da APX e da CAT (Noctor *et al.*, 2002).

A GSH é a principal forma transportadora de enxofre reduzido em plantas. Há relatos de exportação da GSH para raízes em desenvolvimento e de folhas maduras através do floema para frutos

(Foyer; Theodoulou; Delrot, 2001). Estudos apontam para um acúmulo de GSH em plantas submetidas a algumas situações de estresse, como por exemplo, a inibição da CAT ou a exposição ao ozônio. Além disso, em células de tomate, altos níveis de GSH estão associados com resistência a metais pesados e por sua vez, a exposição a tais metais têm demonstrado acelerar a síntese de GSH em raízes e cultura de tecidos. Nesse sentido, pode-se atentar para o fato de a GSH não estar relacionada apenas à proteção contra várias formas de estresse, mas as taxas de síntese e acumulação deste tripeptídeo estarem mediando à sinalização celular de fatores regulatórios (Noctor e Foyer, 1998).

Organismos multicelulares dependem de grandes redes de sinais intra e extracelulares para a realização da comunicação entre células em diversos processos fisiológicos, tais como a organogênese, a manutenção da homeostase tecidual e respostas no reparo de injúrias nos tecidos. Os sinais intracelulares, que podem ser gerados por sinais extracelulares, estão envolvidos em muitos processos de sinalização celular que culminam na ativação de fatores de transcrição que por sua vez regulam a expressão de grupos específicos de genes, responsáveis pelo desempenho de diversas funções celulares (Thannickal e Fanburg, 2000).

Se por um lado as ROS podem causar danos, por outro, também influenciam na expressão de um grande número de genes e nas vias de transdução de sinal (Apel e Hirt, 2004). Isto significa que mudanças associadas ao dano oxidativo e com a restauração da homeostase celular geralmente levam à ativação ou ao silenciamento de genes codificadores de fatores de transcrição, enzimas de defesa antioxidantes e proteínas estruturais. Assim, as células possuem meios de fazer a utilização das ROS como indicadores ambientais e sinais biológicos que ativam o controle de vários programas de resposta genética ao estresse (Dalton; Shertzer; Puga, 1999).

A transdução de sinal desencadeada por ROS pode se dar de forma intra ou extracelular. Do meio externo, as ROS podem ativar sinais intracelulares os quais podem induzir uma cascata de sinalização que culmina na expressão de um ou outro gene. Alternativamente, os componentes da sinalização podem ser diretamente oxidados pelas ROS, constituindo-se em um sinal intracelular. A sinalização mediada por ROS envolve proteínas G-hetero-triméricas e proteínas de fosforilação reguladas por quinases e fosfatases. Por último, ROS ainda podem alterar a expressão gênica através da modificação da atividade de fatores de transcrição (Ahmad; Sarwat; Sharma, 2008).

O chamado *burst* oxidativo, que consiste na rápida e transitória produção de ROS, é considerado um fator marcante no sucesso do processo de reconhecimento de uma planta a um patógeno. Tal produção de ROS ocorre tipicamente no apoplasto em duas fases distintas. A primeira consiste numa fase inespecífica e transitória que ocorre geralmente minutos após a interação com o patógeno. Já a segunda fase, sendo contínua, tem início horas após o ataque do patógeno e geralmente está associada ao estabelecimento de defesas e à resposta de hipersensibilidade (Torres, 2010). A resistência da planta a patógenos depende do fato de a planta ser capaz de reconhecer o patógeno no início do processo de infecção. A resposta de hipersensibilidade consiste na iminente necrose tecidual no local de infecção, que ocorre logo após o reconhecimento do patógeno pela planta. Esta resposta de hipersensibilidade priva o patógeno de receber nutrientes e/ou libera moléculas tóxicas, nesse caso, o invasor tem seu crescimento limitado a uma pequena região da planta. Tal resposta propicia resistência à grande maioria dos patógenos potencialmente danosos (Mehdy, 1994).

As ROS possuem papel na indução, sinalização e execução da morte celular programada, sendo que, paradoxalmente, a morte é considerada parte integral da vida. A morte celular é essencial para o crescimento e desenvolvimento de eucariotos, pois mantém a homeostase dos órgãos e tecidos conforme ocorre proliferação, crescimento e diferenciação celular. A morte celular pode ocorrer sob duas diferentes faces, a morte celular programada e a necrose. A necrose deve-se à morte celular acidental causada por fatores extrínsecos, como acumulação de fitotoxinas específicas, decorrente de um evento traumático. Assim, a morte celular em função da necrose é passiva, indiscriminada e geralmente deve-se à injúria irreversível. Caracteriza-se pela perda progressiva da integridade da membrana que resulta em edema citoplasmático e liberação dos constituintes celulares. Em conformidade, o termo morte celular programada define qualquer forma de morte celular envolvendo um único ou uma série de processos moleculares e celulares ordenados mediados por programas intercelulares, independentemente de desencadeamento externo ou da apresentação de marcas características. Em plantas, ocorre uma maior sobreposição entre as marcas fenotípicas e características moleculares de necrose e apoptose do que em animais, sendo mais difícil diferenciar os dois fenômenos. Nos vegetais, a morte celular programada pode ocorrer durante uma série de processos de desenvolvimento e condições de estresse abiótico, tendo sido descrita durante condições de estresse por falta de oxigênio, temperaturas extremas e exposição ao ozônio. Durante

o desenvolvimento, reportou-se a ocorrência de morte celular programada durante a formação do elemento traqueal, desenvolvimento da semente, germinação e processo de senescência, além da já referenciada resposta de hipersensibilidade (Van Breusegem e Dat, 2006).

Como mencionado, as ROS podem ser também produzidas pelos complexos enzimáticos RBOHs (NADPH oxidases vegetais), cujas funções durante muitos processos vegetais, entre os quais a sinalização por ROS, têm sido alvo de estudos. As RBOHs geram *bursts* de ROS localizados de forma rápida e responsiva. A amplitude, frequência, duração e localização desses *bursts* de ROS são indícios da especificidade da sinalização por ROS (Marino *et al.*, 2012).

Uma das principais rotas através da qual os estímulos extracelulares são traduzidos em respostas intracelulares em todas as células eucarióticas consiste na cascata da proteína kinase mitógeno-ativada (MAPK, em inglês *mitogen-activated protein kinase*). As MAPKs de plantas são ativadas por hormônios, estresses abióticos, patógenos, elicitores derivados de patógenos e ainda são ativados em estágios específicos do ciclo celular (Tena *et al.*, 2001). A ativação das MAPKs ocorre pelo estímulo a montante de MAPK Kinases (MAPKK) através da fosforilação dos resíduos de treonina e tirosina, localizados próximos ao domínio VIII de qualquer kinase. As MAPKK são fosforiladas a montante e assim ativam as MAPKKK. A MAPK pode ser translocada para o núcleo onde as kinases ativam certos grupos de genes através da fosforilação de fatores de transcrição específicos. Através de restrita regulação da localização da MAPK e em função da expressão de certos componentes de sinalização celulares e substratos, em particular, células, tecidos e órgãos, as rotas de MAPK podem mediar a sinalização de um grande número de estímulo extracelular e acarretar em ampla variedade de respostas específicas (Jonak; Ligterink; Hirt, 1999).

## 2.5 O ÁCIDO ABCÍSCO

De ocorrência natural, os hormônios vegetais, ou fitormônios, são substâncias orgânicas que, mesmo presentes a muito baixas concentrações, influenciam processos fisiológicos. Esses processos representam principalmente o crescimento e o desenvolvimento, sendo que outros processos, como por exemplo, o movimento estomático, podem também ser influenciados. Os hormônios não agem sozinhos,

mas sim em conjunto, ou mesmo em oposição uns aos outros, sendo que a condição final de crescimento ou desenvolvimento representa a soma dos efeitos do balanço hormonal (Davies, 2010). Além de participarem da regulação do crescimento e desenvolvimento, os fitormônios também são produzidos em resposta ao estresse biótico e abiótico. Seis são os grandes grupos hormonais vegetais conhecidos, sendo um desses, o ácido abscísico (ABA) (Witzany *et al.*, 2012).

O ABA pertence à classe de metabólitos conhecidos por isoprenoides ou terpenoides, os quais são derivados de um composto de 5 carbonos, o isopentenil (IDP). Duas rotas foram sugeridas para a biossíntese do ABA, (composto de 15 carbonos, figura 6), uma direta, na qual o ABA é originado a partir de um composto de 15 carbonos, o farnesil pirofostato, e outra indireta, na qual o ABA provém de compostos carotenoides de fórmula química de 40 carbonos. Por sua vez, o IDP (composto precursor dos isoprenoides) é sintetizado a partir do ácido mevalônico no citosol, enquanto que nos plastídeos, onde ocorre a síntese de carotenoides, é produzido a partir do piruvato e gliceraldeído 3-fosfato, via formação do 2C-metil-D-eritrol-4 fosfato (MEP) (Nambara e Marion-Poll, 2005; Seo e Koshiba, 2002).

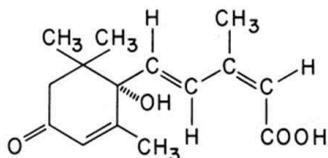


Figura 6 - Fórmula química do ABA (Davies, 2010).

A principal rota de biossíntese do ABA em plantas superiores consiste na derivação do hormônio de compostos carotenoides produzidos nos plastídeos (figura 7). A zeaxantina é produzida como um isômero *trans* após a ciclização e hidroxilação de *trans*-licopeno via  $\beta$ -caroteno. Os passos seguintes consistem na síntese de isômeros *cis* de violaxantina e neoxantina que serão clivados para formar o precursor de ABA de 15 carbonos em sua estrutura. A conversão da zeaxantina a violaxantina é catalisada pela zeaxantina epoxidase via o intermediário anteraxantina. As enzimas que clivam os isômeros *cis* da violoxantina e neoxantina nos produtos C15 e a xantoxina em metabólitos C25 são cis-epoxicarotenoide dioxigenases (NCEDs). O primeiro gene NCED (*VP14*) foi clonado em milho por mutagênese insercional, sendo que os genes NCED formam uma família multigênica. Mutantes de milho *vp14*

mostraram fenótipos deficientes em ABA. Os próximos passos da biossíntese ocorrem no citosol então, a xantoxina deve migrar do plastídeo para esse local. O ABA é então produzido a partir da *cis*-xantoxina após duas reações enzimáticas via intermediário aldeído abscísico. A conversão da xantoxina a aldeído abscísico é catalisada, em *Arabidopsis*, pela AtABA2. A oxidação do aldeído abscísico ao ácido carboxílico é a etapa final da síntese de ABA, catalisada por uma aldeído oxidase. Quanto ao local de produção, o hormônio é sintetizado primariamente em tecidos vasculares, sendo transportado pelo floema e sendo considerado um sinal capaz de atuar a longas distâncias (Nambara e Marion-Poll, 2005).

O catabolismo do ABA é categorizado em dois tipos de reações, hidroxilação e conjugação. Existem 3 rotas de hidroxilação do ABA que realizam a oxidação de um dos grupos metil da estrutura do anel. Após a oxidação, as 3 formas de ABA hidroxiladas (7'-hidróxi ABA, 8'-hidróxi ABA e 9'-hidróxi ABA) possuem atividades biológicas substanciais mas a hidroxilação desencadeia eventos futuros que culminam na inativação, formando os catabólitos ABA: ácido diidrofaseico (DPA), ácido faseico (PA) e neo PA, sendo os dois primeiros os mais abundantes. Outra rota de catabolismo do ABA consiste na sua conjugação com glucose, sendo o principal conjugado formado o ABA glucosil éster (ABA-GE). Apesar de se pensar que o conjugado era fisiologicamente inativo e se acumulava em vacúolos no processo de envelhecimento, descobriu-se que estava envolvido no transporte do ABA a grandes distâncias (Jiang e Hartung, 2008; Nambara e Marion-Poll, 2005).

O nível endógeno de ABA é modulado pelo balanço preciso entre biossíntese e catabolismo desse hormônio. Assim, enzimas participantes da rota de biossíntese, a NCED e do catabolismo, a 8'-hidroxilase são consideradas enzimas regulatórias. Além desses dois principais pontos regulatórios na rota do ABA, outras etapas anteriores do metabolismo do ABA também são importantes para a determinação do nível de ABA. Nesse sentido, por exemplo, a superexpressão de genes que codificam enzimas regulatórias da rota MEP (por exemplo, a enzima 1-deóxi-D-xilulose 5-fosfato sintetase) e da biossíntese de carotenoides (fitoeno sintase) causam acúmulo de ABA em sementes ou plântulas (Nambara e Marion-Poll, 2005).

O ABA desempenha importantes papéis em muitos processos celulares, incluindo desenvolvimento das sementes, dormência, germinação, crescimento vegetativo e respostas a estresses ambientais. Sob condições de não-estresse, o hormônio sesquiterpenoide em células

vegetais se mantêm a baixos níveis. O crescimento normal vegetal necessita de baixos índices de ABA. Os níveis do hormônio podem aumentar drasticamente durante a maturação de sementes e em respostas a estresses ambientais. Esses dois processos fisiológicos têm sido mais estudados no que se refere à função do ABA. Durante o desenvolvimento de sementes ABA é conhecido por iniciar: maturação do embrião, síntese de reservas de estoque e de proteínas abundantes da embriogênese tardia (em inglês LEA, *late embryogenesis-abundant proteins*), bem como iniciador da dormência das sementes, embora o ABA não seja o único regulador nesses processos. Em tecidos vegetativos os níveis de ABA aumentam quando a planta enfrenta condições ambientais adversas, como seca, salinidade e, baixas temperaturas. Embora alto nível de ABA exógeno iniba o crescimento sob condições normais, um aumento na concentração de ABA é benéfico para as plantas sob estresse ambientais. O ABA promove o fechamento dos estômatos para minimizar a perda de água por transpiração quando a planta encontra-se em ambiente com déficit de água. O hormônio também atenua os efeitos do estresse ao ativar genes de resposta ao estresse que vão aumentar a tolerância da planta a esse estresse (Xiong e Zhu, 2003). Além disso, o ABA também atua na defesa da planta contra o estresse biótico uma vez que também regula o fechamento dos estômatos para prevenção da invasão de patógenos. Ainda, o hormônio afeta a resposta a patógenos através da interação com outros hormônios associados com mecanismo de defesa vegetais. Propõe-se que padrões moleculares patógeno associados induzem o fechamento dos estômatos utilizando rotas de transdução de sinais ativas do ABA nas células guarda. Assim, ABA possui um efeito positivo na resistência a doenças através da indução do fechamento estomático. O ácido abscísico serve como um sinal químico em resposta a mudanças no ambiente natural, os quais acarretam estresses bióticos e abióticos em plantas. Tal sinal desencadeia mudanças nos processos fisiológicos e de desenvolvimento, levando a planta à adaptação ao estresse (Lee e Luan, 2012).

Um dos modos de ação do ABA está associado com o estresse oxidativo em células vegetais (Zhang *et al.*, 2006). Experimentos foram conduzidos no intuito de verificar a relação do ABA com o estresse oxidativo e conseqüentemente o seu efeito na regulação dos sistemas antioxidantes em plantas. Foi demonstrado que o ABA pode induzir a expressão de genes do sistema antioxidante e aumentar a capacidade de defesa do sistema antioxidante, incluindo constituintes enzimáticos e

não enzimáticos. As ROS são importantes componentes intermediários na defesa antioxidante induzida pelo ABA (Hu *et al.*, 2007).

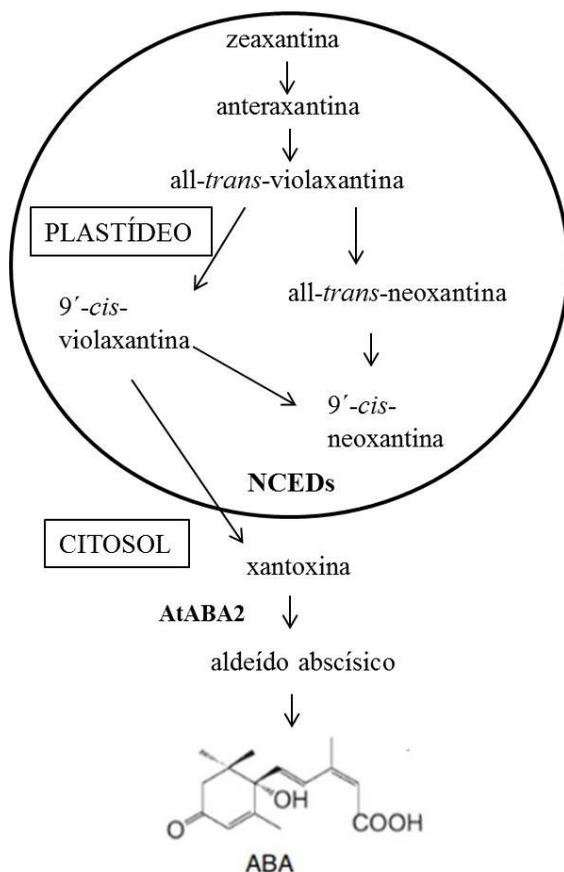


Figura 7 – Rota de biossíntese do ABA. Cis epoxicarotenoide dioxigenases (NCED). Adaptado de Seo e Koshiba, 2002.

Em plântulas de milho, foi demonstrado que tratamento de folhas segmentadas em soluções com baixas concentrações de ABA (10 a 100  $\mu\text{M}$ ) acarretou um aumento discreto nos níveis de radical superóxido e peróxido de hidrogênio e induziu o sistema antioxidante contra o estresse oxidativo, pois houve aumento nas concentrações enzimáticas de SOD, CAT, APX e GR, bem como os conteúdos de ascorbato e glutatona. No entanto, tratamento com alta concentração de ABA (1000  $\mu\text{M}$ ) levou ao dano oxidativo, sendo geradas quantidades excessivas de

radical superóxido e peróxido de hidrogênio, havendo conteúdos de glutatona e ascorbato reduzidos, acarretando os danos a lipídios e proteínas ocorridos nas folhas tratadas com 1000  $\mu\text{M}$  de ABA (Jiang e Zhang, 2001).

Em folhas de milho foi demonstrado que o tratamento com ABA 100  $\mu\text{M}$  por 24 horas induziu um rápido e substancial acúmulo de peróxido de hidrogênio no apoplasto em tecidos não estomáticos, sendo o maior acúmulo observado nas paredes das células do mesófilo localizadas frente aos grandes espaços intercelulares. O acúmulo de peróxido de hidrogênio apoplástico induziu a atividade de enzimas antioxidantes dos cloroplastos e citosol. Isso significa que as ROS produzidas num local específico da célula podem coordenar as atividades antioxidantes de enzimas em diferentes compartimentos subcelulares (Hu *et al.*, 2005). Em outro estudo observou-se que estresse hídrico causado em plantas de milho causou produção de peróxido de hidrogênio principalmente no apoplasto, sendo o ABA um indutor chave na produção de peróxido apoplástico. Nesse caso, sugeriu-se que a ROS produzida no apoplasto não poderia ser difundida livremente pelos compartimentos subcelulares (Hu *et al.*, 2006).

Pesquisas demonstraram também que o tratamento com 100  $\mu\text{M}$  de ABA induziu a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em folhas de milho. Também foi observado um aumento nos níveis de transcritos de genes antioxidantes CAT1, cAPX, GR1, bem como no nível das enzimas antioxidantes (CAT, APX, GR e SOD) em folhas de milho tratadas com ABA (Zhang *et al.*, 2006).

Os estudos citados acima comprovam que o ABA induz o sistema antioxidante em milho, porém, não foi realizado estudo envolvendo variedade de milho com expressão diferencial de flavonoides e também não foi realizada expressão gênica fazendo uso da moderna ferramenta da biologia molecular, a PCR quantitativa.

## 2.6 TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qRT-PCR)

A quantificação de níveis de expressão gênica se tornou uma prática muito usada. Através da medida da quantidade de mRNA celular, pode-se determinar qual a extensão exata da expressão de um gene em particular. Para cada gene, os níveis de expressão mudam drasticamente de célula para célula ou durante as condições experimentais. Várias são as aplicações das quantificações de expressão

gênica nas pesquisas, podendo-se citar como exemplo o estudo da expressão diferencial de um gene quando o organismo encontra-se em diferentes estados fisiológicos (Schmittgen e Livak, 2008).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) se destaca do conjunto das tecnologias-chave que instituíram as ciências atuais. O legado da PCR inclui contribuições notáveis na biologia moderna, medicina, agricultura e biotecnologia, enquanto que sua evolução para PCR quantitativa, com base na fluorescência, contribuiu simultaneamente para o amplo escopo, a conveniência e o alcance dessa tecnologia (Bustin, 2010). Além de ser uma alternativa a algumas técnicas laboratoriais bem estabelecidas, a qPCR possui características que culminam na sua escolha como ferramenta para o desenvolvimento de vários tipos de estudos. Comparada com outras técnicas disponíveis, permite a detecção de um dado ácido nucleico de maneira rápida, específica e sensível. Além disso, permite a quantificação absoluta inicial de um gene alvo (Gachon; Mingam; Charrier, 2004).

A PCR possui 3 fases, exponencial, linear e platô. Na fase exponencial, o produto aumenta exponencialmente uma vez que os reagentes não são limitados. A fase linear é caracterizada por um aumento linear dos produtos, pois os reagentes começam a se tornar limitados. A PCR atinge a fase platô durante os últimos ciclos e a quantidade de produto se torna estável devido à gradativa escassez de alguns reagentes. A quantidade de produto da PCR na fase exponencial é proporcional à quantidade inicial de DNA molde sob condições ideais. Durante a fase inicial, em tais condições, o produto dobra durante cada ciclo se a eficiência da amplificação é 100%. Para que a eficiência atinja valores próximos a 100% na fase exponencial, torna-se necessário que as condições de PCR, características dos iniciadores, pureza do DNA molde e tamanho do fragmento sejam ótimos (Yuan *et al.*, 2006).

A PCR quantitativa permite que a amplificação possa ser acompanhada em tempo real durante a fase exponencial da corrida e, portanto, permite que a quantidade de material inicial seja determinada precisamente. Contrariamente às técnicas de PCR convencional (PCR *end-point*), o resultado independe da fase platô, correspondente à saturação da reação, a qual leva a uma quantificação imprecisa (Gachon; Mingam; Charrier, 2004). Soma-se a isso o fato de a PCR ter evoluído de uma técnica qualitativa com dispêndios maiores de trabalho e tempo investido que se baseava na interpretação visual de géis corados para detectar a presença de produtos de amplificação, para uma PCR quantitativa mais simples e rápida que faz uso da precisão óptica e emprego de corantes fluorescentes que se ligam ao DNA ou sondas

fluorescentes para o monitoramento da amplificação em tempo real (Bustin, 2010). As substâncias mais comumente usadas nos experimentos com PCR incluem ensaios com as sondas TaqMan e com o fluoróforo corante intercalante SYBR Green I (Ginzinger, 2002).

Durante a fase inicial de um experimento de PCR em tempo real, um sinal fluorescente limiar (*threshold*) é determinado e nesse ponto todas as amostras podem ser comparadas. Esse *threshold* é calculado em função da quantidade de fluorescência de fundo (*background*), sendo traçado num ponto onde o sinal gerado a partir de uma amostra é significativamente maior que a fluorescência de fundo. Nesse sentido, o número de ciclos da PCR requerida para gerar quantidade suficiente de sinal fluorescente para atingir o limiar é definido como ciclo limiar (utiliza-se o termo em inglês, *cycle threshold*, Ct). Esses valores de Ct são a base para os cálculos de níveis de expressão de mRNA (Ginzinger, 2002), sendo que o valor numérico do Ct é inversamente proporcional à quantidade de *amplicon* na reação (Schmittgen e Livak, 2008).

A molécula de RNA não pode servir como molde para PCR, portanto, o primeiro passo num ensaio de qRT-PCR é a transcrição reversa do RNA molde em DNA complementar (cDNA) (Bustin, 2000). Assim, a transcrição reversa (RT, *reverse transcription*) seguida da PCR (RT-PCR) constitui-se num método poderoso para a quantificação da expressão gênica (Livak e Schmittgen, 2001). A transcrição reversa consiste na etapa inicial da qRT-PCR, na qual ocorre a síntese do cDNA, pela enzima transcriptase reversa, que usa como molde o RNA extraído de uma amostra para sintetizar o cDNA, que será posteriormente usado como DNA molde para a quantificação dos transcritos.

A quantificação absoluta e a relativa constituem os dois métodos utilizados para realizar a análise dos dados de experimentos de qRT-PCR. A primeira determina o número inicial de cópias do transcrito de interesse, geralmente relacionando o sinal da PCR a uma curva padrão, devendo ser realizada quando se faz necessário determinar o número de cópias absoluto do transcrito. Já a quantificação relativa deve ser usada quando é suficiente reportar a mudança relativa na expressão de um dado gene, uma vez que descreve a mudança na expressão do gene alvo em relação a algum outro grupo de referência ou de uma amostra de tempo zero quando se tem um estudo ao longo do tempo (Livak e Schmittgen, 2001). Nesse tipo de quantificação, as unidades usadas para expressar as quantidades relativas são irrelevantes e essas podem ser comparadas entre múltiplos experimentos de qRT-PCR. A quantificação

relativa constitui-se na ferramenta adequada para investigar pequenas mudanças fisiológicas nos níveis de expressão gênica (Pfaffl, 2006).

A medida da variação na expressão gênica entre amostras tratadas e não tratadas pode ser causada por duas fontes. A primeira consiste na variação biológica, a qual é desejada e explica, por exemplo, diferenças entre os tratamentos. A segunda é devida à variação não específica, por exemplo, qualidade e quantidade de RNA molde ou eficiência na transcrição reversa. O método mais comum de remover a variação não específica é por meio da normalização da expressão dos genes alvo com base na expressão de genes de controle endógeno (Chen; Fessehaie; Arora, 2012; Vandesompele *et al.*, 2002). Assim, para efetuar uma quantificação relativa eficiente, geralmente genes de expressão constante são escolhidos como genes de referência, os quais podem ser um controle endógeno, por exemplo, um gene de referência de expressão constante, um controle exógeno, como um RNA ou DNA controle universal ou artificial, um índice de gene de referência, como uma média de múltiplos controles endógenos, ou ainda um índice de genes alvo, consistindo da média de genes alvo analisados no estudo (Pfaffl, 2006).

Um gene de referência ideal, também conhecido como gene de controle interno, deve ser constitutivo, ou seja, deve ser expresso num nível constante na maioria das células do organismo em estudo, mesmo em diferentes órgãos e estágios de desenvolvimento. Além disso, sua expressão não deve ser afetada pelos parâmetros experimentais. Genes envolvidos em mecanismos celulares básicos (*housekeeping*), como manutenção da estrutura celular ou metabolismo primário são geralmente escolhidos como normalizadores (Almeida *et al.*, 2010). A estratégia do uso de múltiplos genes de controle endógeno tem sido apontada como vantajosa se comparada com o método que faz uso de apenas uma única referência para normalização (Vandesompele *et al.*, 2002).

Uma vez que a quantificação relativa é o objetivo da maioria dos experimentos de PCR, muitos procedimentos para análise dos dados foram desenvolvidos. Dois modelos matemáticos são amplamente utilizados, o modelo de eficiência calibrada, proposto por Pfaffl (2001) e o modelo do  $\Delta\Delta C_t$  proposto por Livak e Schmittgen, 2001. Os sistemas experimentais dos dois modelos são similares, envolvendo amostra controle e tratada, sendo que para cada amostra, um gene alvo e um gene de referência para controle interno são incluídos para amplificação da PCR a partir de alíquotas diluídas de forma seriada. A amplificação da PCR pode ser dada em percentagem ou em aumento do produto da

PCR por ciclo (de 1 a 2). O modelo do  $\Delta\Delta Ct$  é derivado do modelo de eficiência calibrada, e pode ser utilizado caso os genes alvo e de referência atinjam altos valores de eficiência da amplificação da PCR devendo então as eficiências dos genes alvo e de referência serem similares, podendo variar de valores de 1,8 a 2,2 (ou 90 a 110%). Método empregado quando as amostras apresentam homogeneidade, como amostras de cultivo celular expostas a diversos tratamentos (Livak e Schmittgen, 2001; Schmittgen e Livak, 2008; Yuan *et al.*, 2006).

O método do Ct comparativo pode também ser chamado de método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Derivado do método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , o método do  $2^{-\Delta Ct}$  se torna adequado quando no experimento são comparadas amostras de diferentes indivíduos, amostras heterogêneas, sendo  $\Delta Ct = (Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene de controle interno})$ . Usando essa metodologia, os dados são apresentados em taxa de variação (*fold change*) na expressão gênica normalizada em relação a um gene de referência e relativo a uma amostra controle (não tratada ou de tempo zero). Já no que se refere à verificação da variação da expressão de genes de referência sobre as condições experimentais, os dados podem ser apresentados na forma de  $2^{-Ct}$  (Livak e Schmittgen, 2001; Schmittgen e Livak, 2008).

O valor da eficiência da amplificação de uma reação de qRT-PCR é determinado a partir de uma curva padrão feita pela diluição em série de uma amostra representativa de concentração conhecida (Cikos; Bukovska; Koppel, 2007; Livak e Schmittgen, 2001; Schmittgen e Livak, 2008). 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. Dessa forma, se o valor do coeficiente angular das retas for semelhante, as retas serão paralelas, as eficiências serão similares e o cálculo do Ct comparativo pode ser utilizado para quantificação relativa dos genes alvo (Livak e Schmittgen, 2001). Assim, para cada gene podem ser geradas curvas-padrão nas quais se obtêm um valor de coeficiente angular ( $m = \text{slope}$ ), a partir do qual se determina a eficiência (E) da reação de PCR pela fórmula  $m = -(1/\log E)$ . Para valores de eficiência em porcentagem a fórmula usada é:  $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ . Para que os cálculos realizados pelo método do  $\Delta Ct$  sejam válidos, uma eficiência de 2, ou 100%, que corresponde a duplicação do cDNA a cada ciclo, seria ideal, entretanto é aceitável que o valor de eficiência esteja entre 1,8 e 2,2 ou 90 e 110% (Schmittgen e Livak, 2008).

Para complementar a validação de um experimento de qRT-PCR, uma nova curva pode ser gerada através de um gráfico que relacione o logaritmo da concentração de cDNA (diluição em série) *versus*  $\Delta Ct$  (Ct

gene alvo - Ct gene de controle interno), nesse caso, é necessário que o valor do coeficiente angular gerado seja próximo a zero, pois isso significa que as eficiências dos genes alvo e de referência possuem eficiências similares e o cálculo que usa o método do  $\Delta$ CT pode ser usado para a quantificação relativa de transcritos (Livak e Schmittgen, 2001).

Assim, considerando os dados apresentados acerca do ABA, ROS e do sistema antioxidante e com vistas para a aplicabilidade e benefícios oferecidos pelo uso da técnica de qRT-PCR, torna-se relevante o uso dessa ferramenta no estudo da expressão dos genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo e na via de biossíntese de glutathione em plântulas de variedade de milho com baixa expressão de flavonoides (p1-ww).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do ABA na expressão gênica do sistema antioxidante em plântulas de variedade de milho com baixo teor de flavonoides (p1-ww).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Padronizar as condições de quantificação de transcritos para os genes *cat1*, *cat3*, *apx1*, *apx2* e *sod2* às condições experimentais de folhas de milho tratadas com concentrações crescentes de ABA.

Definir um gene de referência adequado para as condições experimentais de tratamento de folhas de milho com ABA.

Investigar por qRT-PCR os níveis de expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo em folhas de milho após tratamento com ABA.

Dosar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando a sonda diaminobenzidina (DAB) em folhas de milho tratadas com concentrações crescentes de ABA.



#### 4 HIPÓTESES

A *tub* será um gene de referência adequado para as condições experimentais de folhas de milho tratadas com concentrações crescentes de ABA.

Os níveis de expressão dos genes do sistema antioxidante analisados serão maiores nas amostras tratadas com ABA (efeito dose-dependente) em comparação as controle.

As folhas tratadas com ABA exibirão maior concentração de  $H_2O_2$  comparadas as controle.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 PLANTAS E TRATAMENTOS

As sementes de milho p1-ww (p-ww 107H, pericarpo branco e sabugo branco) e P1-rr (P-rr 107H, pericarpo vermelho e sabugo vermelho) foram cedidas pelo Maize Genetics Cooperation Stock Center (University of Illinois, Urbana, IL, USA).

As sementes de milho foram germinadas em papel de germinação umidificado e permaneceram por três dias em câmara de germinação, a 25°C no escuro. Após esse período, as sementes foram transferidas para sementeiras contendo solo, as quais permaneceram por sete dias em câmara de crescimento (figura 8) a temperatura de 25°C e fluxo de fótons fotossintéticos de 200  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  mantido durante 14 horas de fotoperíodo, sendo regadas diariamente (Zhang *et al.*, 2006).



Figura 8 - Cultivo das plantas nas sementeiras sob condições controladas.

Após a fase de crescimento, a parte aérea de cada plântula foi cuidadosamente cortada na base e colocada em água destilada por uma hora para eliminar o estresse pelo corte. Em seguida, as plântulas foram transferidas para tubos *falcon* de 15 mL, embrulhados com papel alumínio, os quais continham água destilada (grupo controle) ou

soluções de ácido abscísico (ABA) a concentrações de 10, 100 ou 1000  $\mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Zhang *et al.*, 2006).

As plântulas permaneceram nos tratamentos (figura 9) por 3, 6 ou 12 horas, a temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  e intensidade luminosa contínua de  $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Zhang *et al.*, 2006). Após o período de tratamento, foram coletadas as folhas medianas de 4 plântulas para cada tratamento para cada tempo de coleta. O material coletado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantido a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de RNA para análise de expressão gênica.



Figura 9 – Plântulas nos tratamentos.

#### 4.2 ISOLAMENTO DO RNA E SÍNTESE DE cDNA

O isolamento do RNA, a partir da variedade p1-ww, foi realizado de forma que cada amostra correspondeu a duas plantas. Partindo-se de aproximadamente 100 mg de folha e seguindo as recomendações do fabricante, o RNA foi isolado pelo uso do RNeasy Plant Minikit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Foi realizada a quantificação do RNA em espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop™ 2000. Em seguida, no intuito de eliminar possíveis resquícios de DNA, as amostras foram tratadas com DNase (Sigma-Aldrich) e, então, novamente quantificadas em espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop™ 2000. Diluições necessárias foram feitas para a obtenção de 2  $\mu\text{g}$  de RNA total para a

síntese de cDNA com o uso do High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Seguindo as instruções do fabricante e utilizando iniciador oligo-dT 10  $\mu\text{M}$  foi obtido um volume final de 50  $\mu\text{L}$  de cDNA a concentração de 40 ng/ $\mu\text{L}$ . Esse material foi armazenado a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### 4.3 DESENHO DOS INICIADORES PARA qRT-PCR

O software Primer Express™ v 3.0 (Applied Biosystems) foi utilizado para desenhar os oligonucleotídeos específicos (iniciadores) para quantificação dos transcritos por qRT-PCR, exceto os iniciadores do gene da actina do milho (*Zmact*) desenhados por Zhang *et al.*, (2010),  *$\gamma$ -ecs*, *gsh-s* desenhados por Mello *et al.*, (2012) e *gst23* e *act* desenhados por Hermes *et al.*, no prelo. As sequências dos iniciadores utilizados para quantificação dos transcritos estão apresentadas na tabela 1.

#### 4.4 TITULAÇÃO DE INICIADORES PARA qRT-PCR

Na busca da concentração ideal dos iniciadores desenhados, na qual haveria a amplificação mais efetiva, foi realizada a titulação dos iniciadores testando as possíveis combinações de concentrações de 500, 300 e 100 nM dos iniciadores *forward* e *reverse*, usando cDNA de amostra controle na quantidade de 20 ng por reação.

#### 4.5 SELEÇÃO DE GENE DE REFERÊNCIA PARA qRT-PCR

Na seleção do gene de referência para as análises de RT-PCR quantitativa de folhas de plântulas de milho tratadas com ABA foi realizada uma comparação entre as concentrações de transcritos de 3 genes candidatos a gene de referência, o qual serviria para ser comparado com os genes alvo na quantificação relativa dos transcritos alvo. Para tanto, foi determinada a variação de cada gene entre os diferentes tempos e tratamentos através da equação  $2^{-\text{Ct}}$  (Schmittgen e Livak, 2008). Nesse caso, realizou-se uma comparação entre os valores da razão obtida entre as médias de  $2^{-\text{Ct}}$  para os diferentes grupos (controles e tratados com 10, 100 e 1000  $\mu\text{M}$  de ABA para os tempos de tratamento de 3, 6 e 12 horas), utilizando como normalizador a média de

$2^{-Ct}$  do grupo controle 3 horas ( $2^{-Ct \text{ grupo}} / 2^{-Cdo \text{ grupo controle } 3h}$ ). Além disso, foi realizada uma média geométrica entre os Cts dos genes *Zmact* e *tub*. Esse novo valor obtido foi utilizado para o cálculo do  $2^{-Ct}$  como descrito acima.

Tabela 1 - Sequência de iniciadores e concentrações usadas para quantificação de transcritos em *Zea mays* por qRT-PCR.

Genes de <i>Zea mays</i>	Iniciadores	Concentração (nM)	Tamanho do Fragmento (pb)	Tm Teórico do Fragmento (oC)	Nº Acesso GenBank
<i>α-tubulina</i>	GCGCACCATCCAGTTCGT	300	60	84	X73980
	CTGGTAGTTGATTCCGCACTTG	300			
<i>actina</i>	GCAGCATGAAGGTTAAAGTGATTG	300	62	81	NM_001155 179.1
	GCCACCGATCCAGACACTGT	300			
<i>Zm actina</i>	GCCATCCATGATCGGTATGG	500	70	81	EU952376
	GTCGCACTTCATGATGGAGTTG	300			
<i>g-glutamylcisteína sintetase</i>	TTCTTGGGCTTGGCTTCA	300	62	79	AJ302783
	TCCCTTTGGCATTATTGGTATGT	300			
<i>glutathione sintetase</i>	GCTCCCAGCACATTTCCA	300	99	80	AJ302784
	GAAATTCCCGTCCATGCTAACA	300			
<i>glutathione S-transferase 23</i>	GGCTAGTAATTCTGGAGCAGCTAGTT	500	76	79	NM_001111 524.1
	GCAAAGTGCAACCAGTCCTTA	500			
<i>glutathione redutase 1</i>	GCCCCTCAAGGCCACTCT	500	70	81	AJ006055.1
	TGACGTAGCGCACACAAGAATC	500			
<i>ascorbato peroxidase 1</i>	CACCTCAAGCTCTCCGAAGCTG	500	63	82	NM_001156 720.1
	GTCCCGCTCCAGGATATGG	100			
<i>ascorbato peroxidase 2</i>	AGGCCTTCTGCAGCTACCAA	500	58	83	NM_001112 030.1
	TGGGCGGAAGGATGGAT	100			
<i>catalase 1</i>	GATGGGTTGACGCACTGACA	500	60	82	NM_001111 945.1
	AGATCCAAATGGTACGGTGTCA	300			
<i>catalase3</i>	TCGCTCGGACACCCAAAG	500	59	85	NM_001111 946.1
	GGCGAGGAGGTCTATCCAGAT	500			
<i>superoxide dismutase 2</i>	CAGAGACAATGGTGAAGGCAGTT	500	61	82	NM_001111 865.1
	AAGATGGTGCCCTTGACATCA	100			

#### 4.6 VALIDAÇÃO DE GENES PARA qRT-PCR

Visando determinar a eficiência das amplificações, curvas de validação para cada gene foram realizadas, utilizando cDNA de amostra controle, através de uma diluição seriada em água (diluição de 5 vezes, de 100 ng até 0,16 ng de cDNA). Então, foi plotado em gráficos o Ct (eixo y) *versus* o logaritmo da diluição do cDNA, para cada gene. A partir da inclinação da reta gerada (*slope*, m), a eficiência da PCR foi calculada a partir da equação  $m = - (1/\log E)$ . Para valores de eficiência em porcentagem a fórmula usada é:  $E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$ . Na sequência, foram gerados gráficos da curva padrão de cada gene alvo em comparação à curva do gene constitutivo (*α-tubulina*), nesse caso, usando-se logaritmo da diluição *versus* ΔCt, onde delta Ct = Ct gene alvo – Ct gene de referência (Schmittgen e Livak, 2008).

#### 4.7 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE TRANSCRITOS POR qRT-PCR

Os níveis de quantificação relativa dos genes *act*, *Zmact*, *γ-ecs*, *gshs*, *gsr1*, *gst23*, *apx1*, *apx2*, *cat1*, *cat3* e *sod2* foram analisados em relação à *α-tubulina* (*tub*), gene de referência, e foram calculados através do método do Ct comparativo, ou ΔCT, no qual se calcula as variações na expressão gênica pela equação  $2^{-\Delta Ct}$ , sendo  $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene da } \alpha\text{-tubulina}$  (Schmittgen e Livak, 2008). Os valores foram normalizados em relação à média dos valores  $2^{-\Delta Ct}$  das amostras controle que permaneceram por 3 horas no tratamento (água) para cada repetição.

#### 4.8 CONDIÇÕES DE qRT-PCR

As reações de amplificação das amostras por qRT-PCR foram efetuadas em triplicatas em poços adjacentes na mesma placa de PCR tanto para placas de titulação quanto para as de curvas de eficiência e para as placas de quantificação relativa dos transcritos das amostras para cada gene.

As reações foram realizadas usando 10 μL de SYBR Green PCR Master Mix 2X (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) e 40 ng de amostra de cDNA, exceto para a titulação, realizada com 20 ng de

cDNA. As condições de amplificação foram realizadas com uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Após cada corrida, foi gerada uma curva de dissociação com aumento linear da temperatura de 60°C a 95°C. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no sistema ABI PRISM® 7500 Detection System (Applied Biosystems).

#### 4.9 DESENHO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a quantificação de transcritos, foram realizadas 3 replicatas biológicas do experimento de tratamento com ABA da planta p1-ww. Para cada replicata biológica, foram realizadas 2 extrações de RNA, sendo cada extração composta por um *pool* de 2 plântulas, totalizando 6 extrações de cada tratamento e tempo de coleta. Uma vez que as amostras foram amplificadas em triplicatas na placa de PCR, para cada tratamento e tempo de coleta, obteve-se n=18.

As análises estatísticas foram realizadas através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. O nível de significância foi de 99% ( $p < 0,01$ ). As análises estatísticas foram conduzidas através do uso da linguagem R v2.15.2 (R Development Core Team (2011). R: A language an environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>). Para as análises estatísticas da seleção do gene de referência, foi realizada a comparação entre os tempos de 3, 6 e 12 horas. No entanto, o teste estatístico para quantificação dos transcritos foi realizado para cada tempo em separado, de forma que se tornasse possível a comparação entre os tratamentos para cada tempo de coleta de cada gene.

#### 4.10 DETECÇÃO HISTOQUÍMICA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM FOLHAS DE PLÂNTULAS DE MILHO

Foi realizada a técnica de visualização do peróxido de hidrogênio que usa como substrato a diaminobenzidina (DAB, 3,3'-*Diaminobenzidine tetrahydrochloride*, Sigma-Aldrich) (Orozco-Cardenas e Ryan, 1999; Thordal-Christensen *et al.*, 1997).

As plântulas p1-ww foram cuidadosamente cortadas na base do caule e colocadas em tubos *falcon* embrulhados em papel alumínio, contendo solução de DAB, a 1 mg/mL, pH 3,8, onde permaneceram por

8 horas, na luz a 25°C. Em seguida, foram expostas aos tratamentos ABA. Após 3 horas de tratamentos, as folhas medianas das plântulas foram imersas em etanol 96% fervente por 10 minutos, sendo em seguida transferidas para etanol 96% a temperatura ambiente, devendo ficar nesse tratamento por 4 horas para total extração da clorofila. Esse procedimento descolore a folha, exceto pelo produto marrom resultante da polimerização do DAB com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em presença de peroxidase (Orozco-Cardenas e Ryan, 1999; Thordal-Christensen et al., 1997; Zhang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010). Então, as imagens das folhas foram registradas.

Foram aplicadas algumas variações da técnica. Primeiramente, utilizou-se água miliQ no preparo das soluções e as plântulas, após serem retiradas das soluções de DAB (onde permaneceram por 8 horas), foram colocadas em água ou nas soluções de ABA (aqui referido como Experimento DAB1). Depois, a técnica passou a ser executada de forma que as plântulas deveriam permanecer durante todo o tempo de tratamento na solução de DAB, sendo o ABA (1000 µM), ou a água adicionados às soluções de DAB (obtendo-se uma solução de ABA 100 µM ou controle ABA 0 µM (Experimento DAB2). Posteriormente, passou-se a usar água destilada ao invés de água miliQ e a intensidade luminosa em que as plântulas permaneciam durante os tratamentos foi reduzida pela metade. Dessa vez, as plântulas permaneceram por 5 horas no DAB (Hu *et al.*, 2009). Na sequência, foi realizado o experimento (DAB 4) com outra variedade de milho, a P1-rr, a qual possui expressão de flavonoides aumentada e coloração roxa do grão, e além disso, o pH da solução de DAB foi ajustado para 7 antes da adição das plântulas (Snyrychova *et al.*, 2009). Por fim, realizou-se mais uma vez o experimento com o milho p1-ww (Experimento DAB 5). Cabe ressaltar que, uma vez estabelecida uma nova condição, essa foi mantida no próximo experimento. Além disso, nos experimentos, nem sempre as plântulas foram expostas a todas as concentrações de ABA.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 TITULAÇÃO DOS INICIADORES PARA qRT-PCR

Para ser realizada a quantificação dos transcritos de genes alvo por qRT-PCR das amostras de plântula de milho tratadas com água ou com diferentes concentrações de ABA, primeiramente foi realizada a titulação dos iniciadores desenhados para qRT-PCR usando o fluoróforo intercalante SYBR Green, sendo avaliada a concentração ideal dos iniciadores *forward* e *reverse* para amplificação específica do fragmento de cDNA desejado. Alguns iniciadores já haviam sido titulados anteriormente: *act*, *γ-ecs*, *gsh-s* (Mello *et al.*, 2010), *gst23*, *sod2*, *Zmact*, *mpk5*, *rbohA*, *rbohB*, *rbohC* e *rbohD*.

Os demais iniciadores (*tub*, *cat1*, *cat2*, *cat3*, *apx1*, *apx2*, *apx3* e *gsr1*) foram titulados combinando-se concentrações de 100, 300 e 500 nM, a partir de uma amostra de cDNA controle a 20 ng/μL. Analisando as curvas de amplificação dessas reações, optou-se pela combinação de concentrações de iniciadores nas quais o Ct era mais baixo e as triplicatas apresentavam-se mais próximas. Além disso, deveriam apresentar um único pico na curva de *melting* (desnaturação), confirmando a amplificação de um único produto para cada alvo (tabela 2). O transcrito alvo *apx3* não apresentou uma boa amplificação, sendo excluído das análises (Dados não mostrados). Os gráficos da curva de amplificação dos demais alvos bem como as curvas de *melting* para as concentrações estabelecidas como padrões para cada par de iniciadores estão apresentados nas figuras 10 e 11. Observa-se que as triplicatas estão sobrepostas (página 10) e que existe um único pico na curva de dissociação (figura 11), sendo assim, as condições são adequadas para a quantificação de transcritos.

Tabela 2 – Concentrações definidas para cada par de iniciadores após titulação.

Genes de <i>Zea mays</i>		Concentração (nM) <i>forward</i>	Concentração (nM) <i>reverse</i>
<i>α-tubulina</i>	<i>tub</i>	300	300
<i>actina</i>	<i>act</i>	300	300
<i>Zm actina</i>	<i>Zmact</i>	500	300
<i>γ-glutamilcisteína sintetase</i>	<i>g-ecs</i>	300	300
<i>glutaciona sintetase</i>	<i>gsh-s</i>	300	300
<i>glutaciona S-transferase 23</i>	<i>gst23</i>	500	500
<i>glutaciona redutase 1</i>	<i>gsr1</i>	500	500
<i>ascorbato peroxidase 1</i>	<i>apx1</i>	500	100
<i>ascorbato peroxidase 2</i>	<i>apx2</i>	500	100
<i>catalase 1</i>	<i>cat1</i>	500	300
<i>catalase3</i>	<i>cat3</i>	500	500
<i>superoxide dismutase 2</i>	<i>sod2</i>	500	100

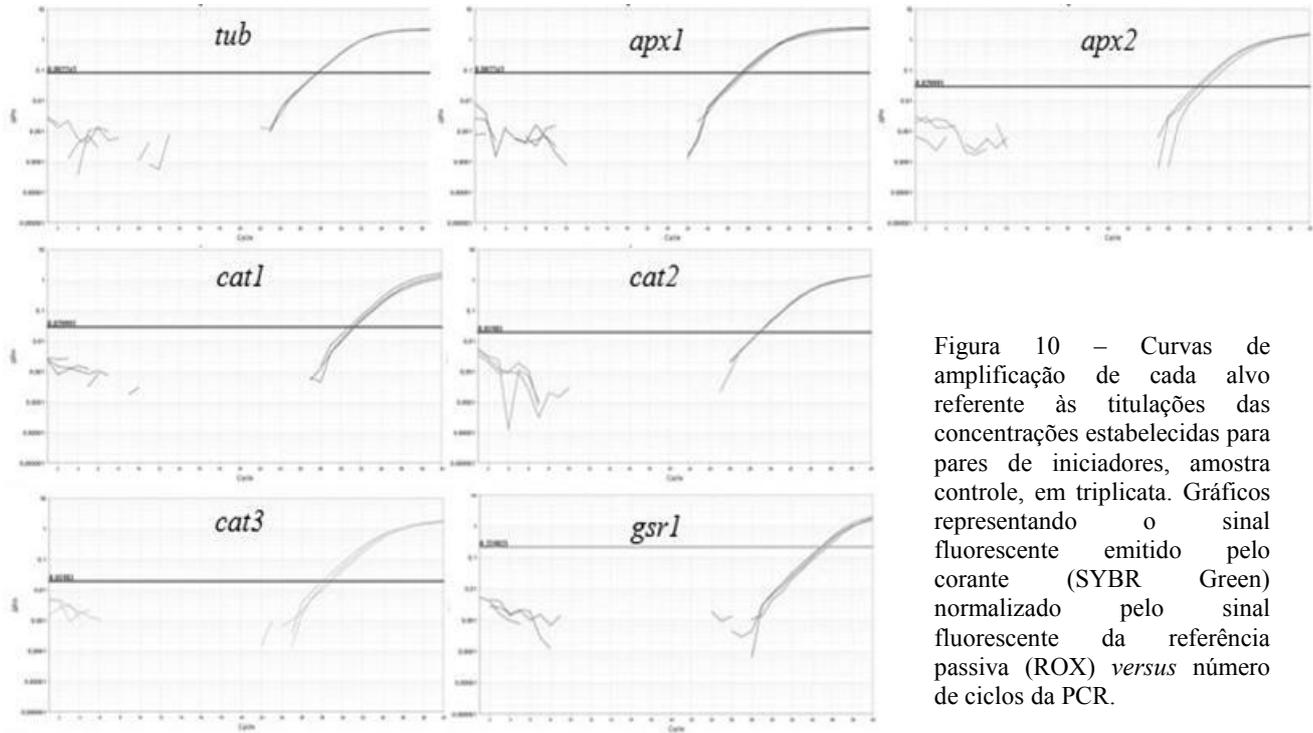


Figura 10 – Curvas de amplificação de cada alvo referente às titulações das concentrações estabelecidas para pares de iniciadores, amostra controle, em triplicata. Gráficos representando o sinal fluorescente emitido pelo corante (SYBR Green) normalizado pelo sinal fluorescente da referência passiva (ROX) versus número de ciclos da PCR.

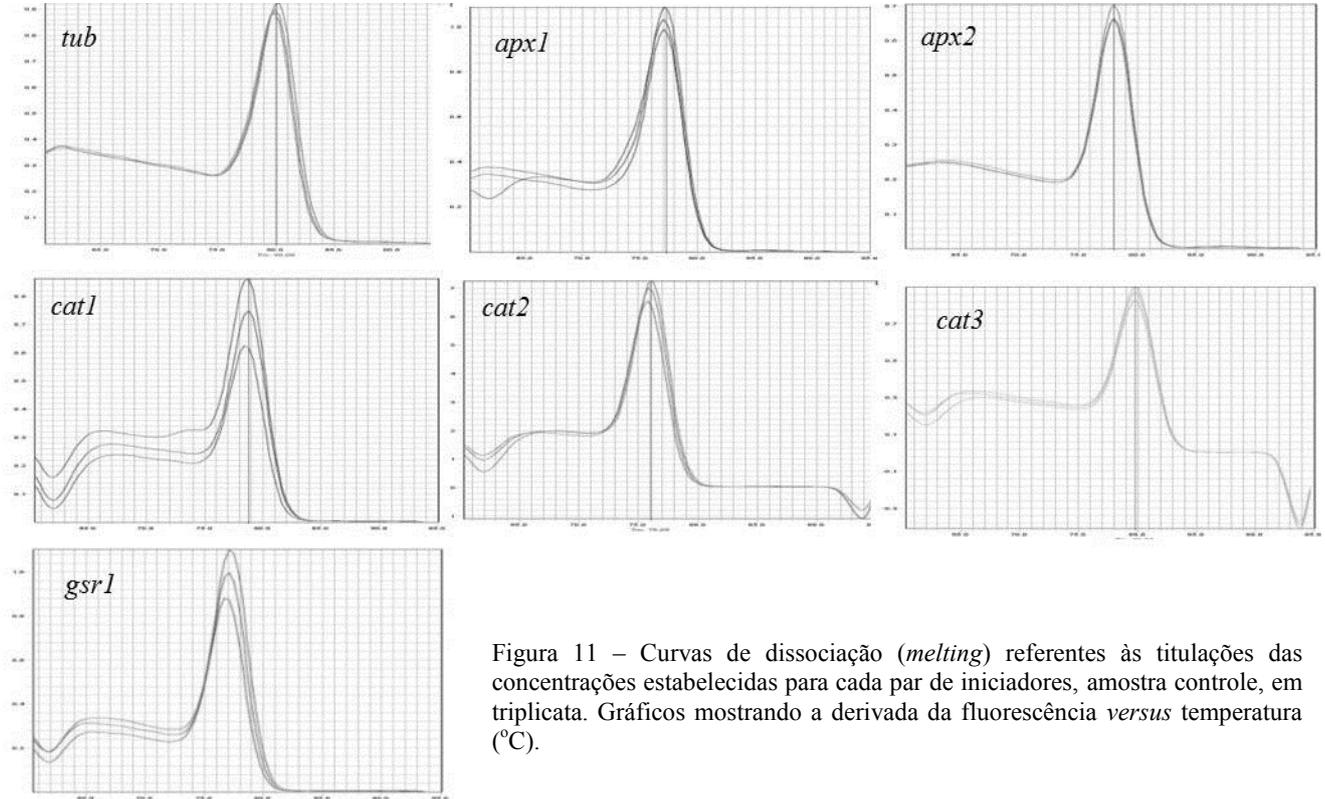


Figura 11 – Curvas de dissociação (*melting*) referentes às titulações das concentrações estabelecidas para cada par de iniciadores, amostra controle, em triplicata. Gráficos mostrando a derivada da fluorescência *versus* temperatura (°C).

## 5.2 SELEÇÃO DE GENE DE REFERÊNCIA PARA AS ANÁLISES DE qRT-PCR

Antes de realizar as análises de qRT-PCR, foi feita uma comparação entre 3 genes candidatos a genes de referência. Na busca de um gene que tivesse sua expressão constante nas folhas e que não apresentasse variação de expressão em resposta aos tratamentos com ABA, foi verificada a expressão de *tub*, *act* e *Zmact*. Os cálculos da expressão para cada gene foram realizados com base na média de  $2^{-Ct}$  entre as 3 repetições do experimento e comparados entre as amostras tratadas com diferentes concentrações de ABA e controle. Os dados foram normalizados pela média de  $2^{-Ct}$  do grupo controle 3 horas como descrito em material e métodos.

Dos 3 candidatos a gene de referência, o que mostrou amplificação mais homogênea foi *tub*, sendo as expressões de *act* e *Zmact* muito variadas para serem usados como gene de referência. Então, foi realizada uma tentativa de se obter um padrão de expressão mais regular realizando-se a média geométrica entre os Cts obtidos para *tub* e *Zmact* (cálculos apresentados em material e métodos). Mesmo assim, a variação encontrada foi maior que a apresentada por *tub* (figura 12 e 13). Em função desses resultados, *act* e *Zmact* foram analisados como transcritos alvo.

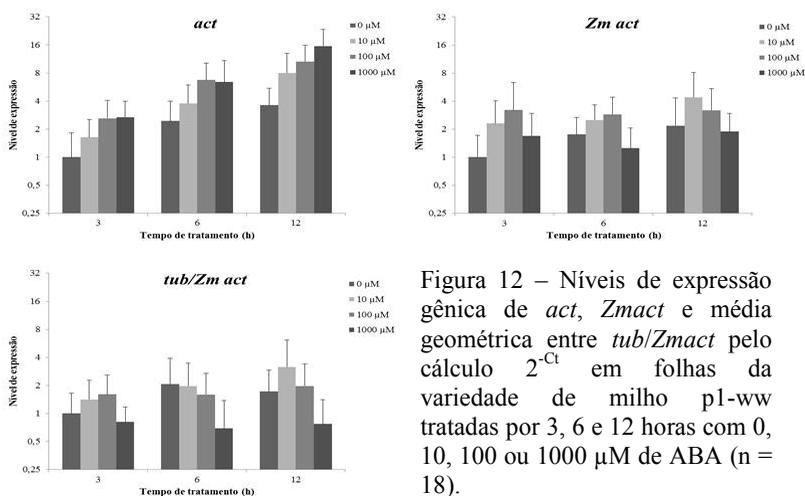


Figura 12 – Níveis de expressão gênica de *act*, *Zmact* e média geométrica entre *tub/Zmact* pelo cálculo  $2^{-Ct}$  em folhas da variedade de milho p1-ww tratadas por 3, 6 e 12 horas com 0, 10, 100 ou 1000 µM de ABA (n = 18).

Apesar de ser o gene de expressão mais constante dentre os 3 analisados, o padrão de expressão da *tub* não foi o ideal, mostrando variações (tanto aumentos quanto diminuições) consideráveis. Para o tratamento com ABA a 1000  $\mu\text{M}$ , houve uma diminuição notável na quantidade de transcritos: de 1 para 0,46 em 3 horas, para 0,37 nas 6 horas e para 0,33 nas 12 horas (figura 13). Para averiguar se as diferenças obtidas eram estatisticamente significativas, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, com 99% de significância, entre todas as concentrações e tempos de tratamento. Os resultados indicaram a possibilidade de agrupamento das concentrações de 0, 10 e 100  $\mu\text{M}$ , indicando, no entanto, a impossibilidade de agregar todas as concentrações num mesmo grupo. Por esse motivo, a concentração de ABA 1000  $\mu\text{M}$  foi excluída das análises estatísticas, no entanto, ela foi apresentada nos gráficos de quantificação relativa de cada gene.

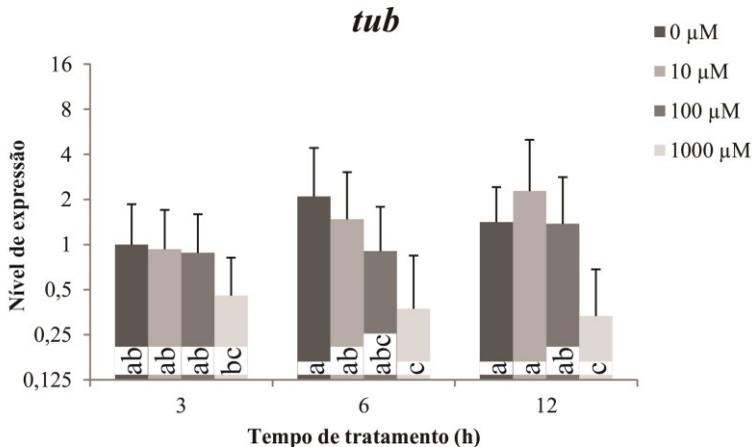


Figura 13 - Níveis de expressão gênica (pelo cálculo  $2^{-C_t}$ ) de *tub* em resposta aos tratamentos com 0, 10, 100 ou 1000  $\mu\text{M}$  de ABA de folhas da variedade de milho p1-wv por 3, 6 e 12 horas. Letras iguais indicam que não existem diferenças significativas pelo Teste de Kruskal-Wallis,  $\alpha=0,01$  ( $n = 18$ ).

### 5.3 VALIDAÇÃO DO EXPERIMENTO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS POR qRT-PCR

Após a determinação das concentrações dos iniciadores e seleção do gene de referência, foi possível realizar as curvas de validação, nas

quais foi mantida então, a concentração dos iniciadores fixas, sendo realizada diluição em série de uma amostra de cDNA do grupo controle.

Para cada gene alvo foram geradas curvas-padrão nas quais a declividade da reta (*slope*), foi usada para determinar a eficiência da qPCR. Alguns genes utilizados como genes alvo no presente estudo já haviam sido validados: *γ-ecs*, *gsh-s* e *act* (Mello *et al.*, 2012) e *gst23* e *sod2*. As curvas de validação dos genes *tub*, *Zmact*, *apx1*, *apx2*, *cat1*, *cat3* e *gsr1* foram realizadas após diluição seriada do cDNA nas concentrações de 100 ng/μL, 20 ng/μL, 4 ng/μL, 0,8 ng/μL e 0,16 ng/μL. Considerando que cada placa para PCR em tempo real tem espaço para 96 amostras, não foi possível realizar todas as curvas simultaneamente na mesma placa. Sendo assim, o par de iniciadores para o gene controle (*tub*) teve uma curva realizada em cada placa de validação, para que as curvas dos genes alvo pudessem ser comparadas com esta sob as mesmas condições (figura 14 e 15). Para verificar se as eficiências de cada gene alvo e do gene de referência *tub* estavam paralelas, foi calculada a variação do delta Ct conforme a diluição da amostra (figura 16).

Os genes da *cat2*, *mpk5*, *RbohA*, *RbohB*, *RbohC* e *RbohD* (tabela 3) não foram incluídos nas análises de expressão uma vez que a amplificação não foi considerada homogênea entre as triplicatas das placas de PCR (*cat2*) ou os resultados das curvas de validação não foram satisfatórios, apresentando eficiência fora dos padrões aceitáveis, ou seja eficiência fora do intervalo de 1,8 a 2,2, ou 90 e 110% (Schmittgen e Livak, 2008). Nesse caso, os demais genes da tabela 3 foram excluídos das análises de expressão gênica, pois não cumpriam os requisitos para serem calculados pelo método do Ct comparativo (Dados não mostrados).

Os valores de eficiência e  $R^2$  das curvas de validação obtidos com os iniciadores investigados no presente estudo encontram-se na tabela 4, agrupados conforme as placas realizadas, sendo que *tub* aparece numerada de acordo com cada corrida (I, II, III, IV, V). Os alvos *act*, *γ-ecs*, *gsh-s*, *gst23* e *sod2* já haviam sido validados anteriormente (Hermes *et al.*, no prelo) e foram incluídos nesse trabalho como genes alvo.

Tabela 3 – Iniciadores testados, mas não incluídos nas análises de quantificação de transcritos.

<b>Genes de <i>Zea mays</i></b>	<b>Iniciadores</b>	<b>Concentração (nM)</b>	<b>Nº Acesso GenBank</b>	<b>Referência</b>
<i>catalase 2</i>	<i>cat2</i> TCATCATACGCATGGAACCAA GCGGAAACGCGATTCTAGTAC	500 100	NM_001111840 .1	Este estudo
<i>MAP kinase 5</i>	<i>mpk5</i> TCTGCTCGGCGGTCAACT AAGGCGTTGGCGATCTTCTT	500 100	AB016802	Zhang et al, 2010
<i>homólogos A da oxidase do burst respiratório</i>	<i>rbohA</i> CACACGTGACCTGCGACTTC CCCCAAGGTGGCCATGA	100 300	DQ855284	Zhang et al, 2010
<i>homólogos B da oxidase do burst respiratório</i>	<i>rbohB</i> GGCCAGTACTTCGGTGAAACA ATTACACCAGTGATGCCTTCCA	500 300	EU807966	Zhang et al, 2010
<i>homólogos C da oxidase do burst respiratório</i>	<i>rbohC</i> TTCTCTTGCCCTGTATGCCGC CTTTCGTATTCCGCGAGCCA	100 500	DQ897930	Zhang et al, 2010
<i>homólogos D da oxidase do burst respiratório</i>	<i>rbohD</i> CCGGCTGCAGACGTTCTT CCTGATCCGTGATCTTCGAAA	500 500	EF364442	Zhang et al, 2010

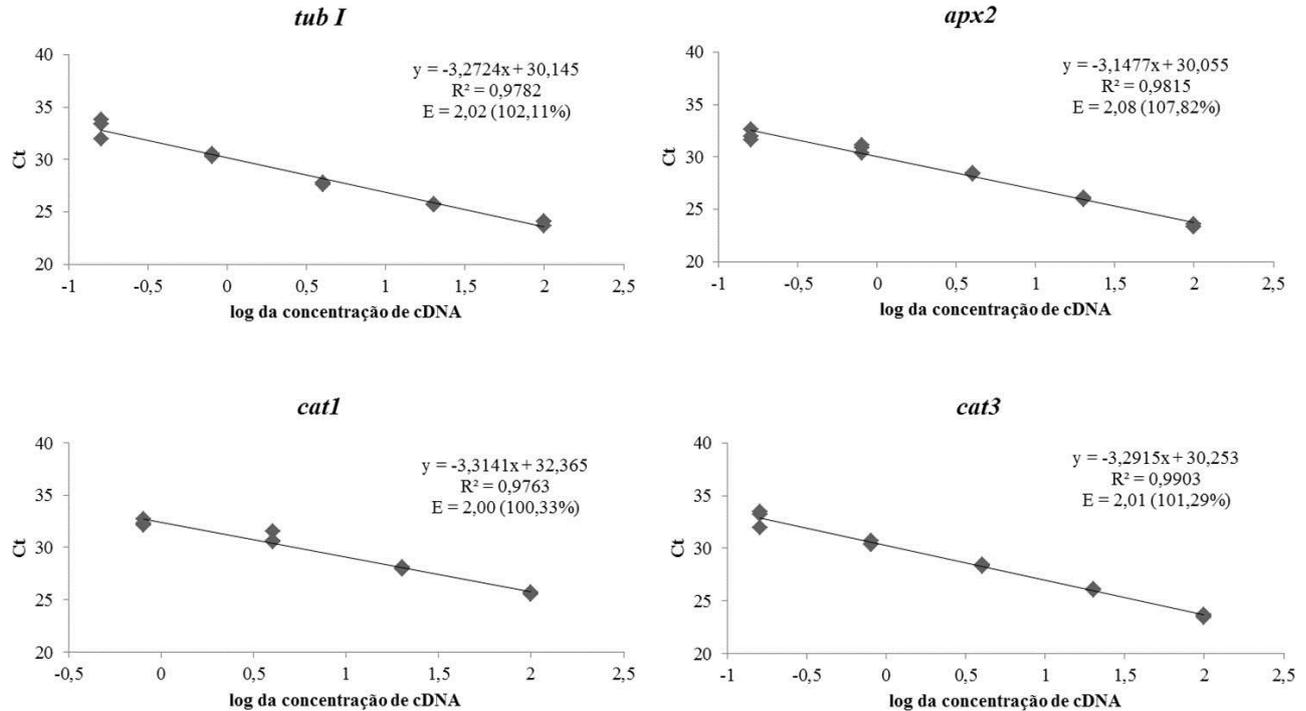


Figura 14 - Curvas-padrão obtidas para validação de amplificação dos alvos. Placa de PCR número 1 (*tub I*, *apx2*, *cat1* e *cat3*).

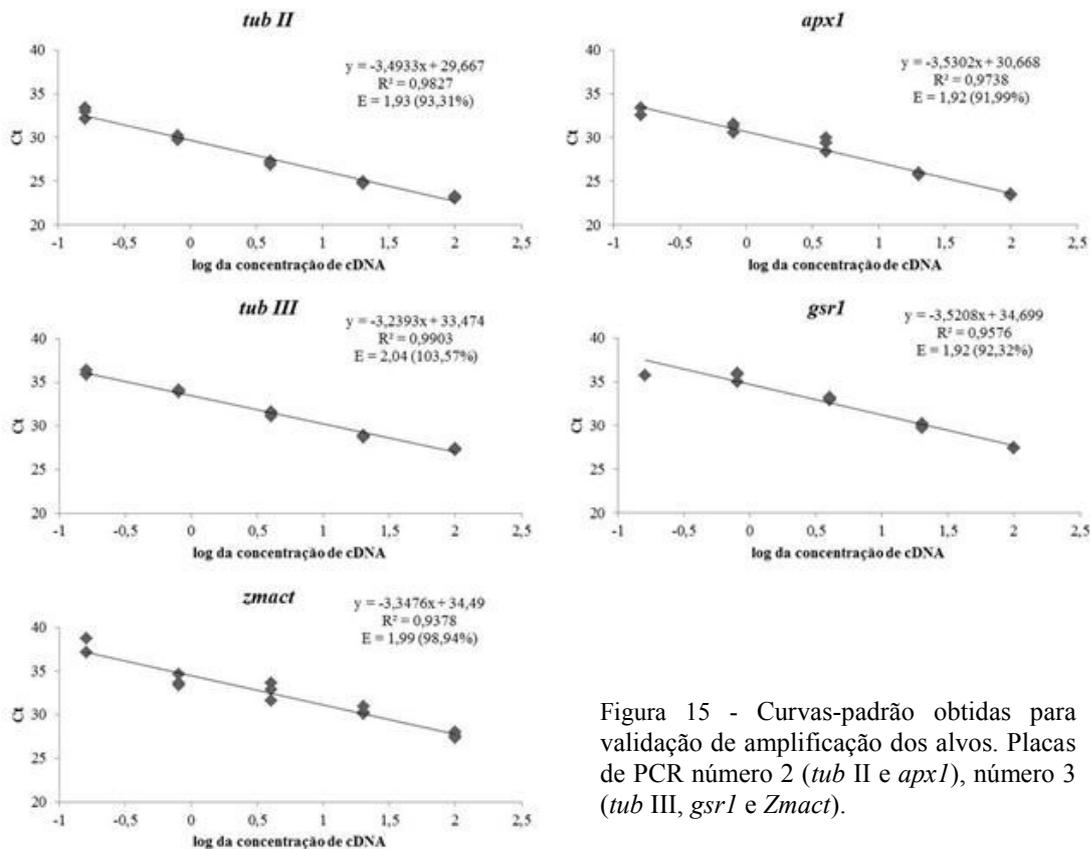


Figura 15 - Curvas-padrão obtidas para validação de amplificação dos alvos. Placas de PCR número 2 (*tub II* e *apx1*), número 3 (*tub III*, *gsr1* e *Zmac1*).

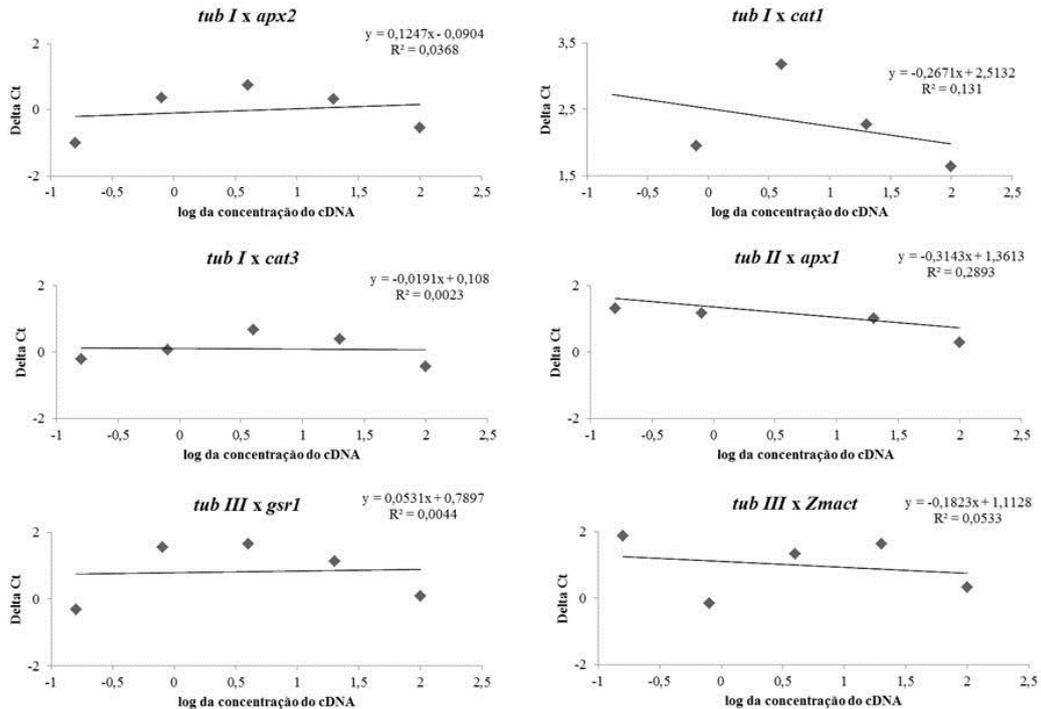


Figura 16 - Delta Ct (Ct gene alvo – Ct gene de referência) para cada diluição de cDNA *versus* logaritmo da diluição seriada do cDNA .a partir de 100 até 0,16 ng. Cada *tub* (I, II e III) corresponde a uma placa de PCR.

#### 5.4 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES-ALVO POR qRT-PCR

Esse trabalho teve a finalidade de investigar a expressão dos genes *act*, *Zmact*, *cat1*, *cat3*, *apx1*, *apx3*, *sod2*, *gsr1*, *gsh-s*, *γ-ecs* e *gst23* em folhas de plântulas de milho, variedade p1-ww, na presença de diferentes concentrações de ABA (Zhang *et al.*, 2006; Jiang e Zhang, 2001). A expressão relativa dos genes alvo foi estimada nas amostras de folha tratadas em relação a plantas controle não tratadas para cada tempo de coleta, utilizando a *α-tubulina* como gene de referência.

Todos os resultados apresentados a seguir são estatisticamente significativos pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 99%. Como já mencionado anteriormente, as amostras que receberam concentração de 1000  $\mu\text{M}$  de ABA terão seus dados apresentados nos gráficos (figura 17, 18 e 19), porém não foram incluídos nas análises estatísticas. Além disso, é necessário lembrar que as análises estatísticas foram realizadas para cada tempo de coleta do mesmo gene em separado. Dessa forma, cada gene foi contemplado com 3 análises estatísticas em separado (para 3, 6 e 12 horas).

Os valores dos níveis de transcritos do gene *act* (figura 17) obtidos para o tempo 3 horas foram 1 (controle) e 2 (100  $\mu\text{M}$  de ABA). Para 6 horas, os valores de expressão do grupo controle e do grupo 100  $\mu\text{M}$  foram de 2 e 7, respectivamente. Para 12 horas, foi verificado aumento do grupo controle em relação ao grupo tratado com 100  $\mu\text{M}$  de ABA, com valores passando de 2 para 10.

Com relação ao gene *Zmact*, houve aumento nos níveis de transcritos para os 3 tempos de coleta na concentração de 100  $\mu\text{M}$  de ABA em relação à água. O aumento foi de 3,3 vezes para 3 horas, 2,9 vezes para 6 horas e 2,8 vezes para 12 horas de tratamento (figura 17).

Tabela 4 – Valores de eficiência, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e temperatura de *melting* ( $T_m$ ) obtidos nas curvas de validação. *Tub I* –valores referentes a curva de validação realizada na primeira placa de PCR em tempo real; *tub II* – valores referentes a curva de validação realizada na segunda placa de PCR; *tub III* – valores referentes a curva de validação realizada na terceira placa de PCR; *tub IV* – valores referentes a curva de validação realizada na quarta placa de PCR; *tub IV* – valores referentes a curva de validação realizada na quarta placa de PCR.

Gene		Eficiência (%)	$R^2$	$T_m$ experimental (°C)
<i>α-tubulina I*</i>	<i>tub</i>	95,38	0,9953	79,5
<i>actina*</i>	<i>act</i>	95,27	0,9845	74,8
<i>γ-glutamil cisteína sintetase*</i>	<i>γ-ecs</i>	93,57	0,9734	75,9
<i>glutaciona sintetase*</i>	<i>gsh-s</i>	98,04	0,988	81
<i>glutaciona S-transferase*</i>	<i>gst23</i>	90,65	0,9783	76,7
<i>α-tubulina II</i>	<i>tub I</i>	102,11	0,9782	80
<i>ascorbato peroxidase2</i>	<i>apx2</i>	107,82	0,9815	78,6
<i>catalase1</i>	<i>cat1</i>	100,33	0,9793	77
<i>catalase2</i>	<i>cat2</i>	110,95	0,9425	75,9
<i>catalase3</i>	<i>cat3</i>	101,28	0,9903	80,4
<i>α-tubulina III</i>	<i>tubII</i>	93,31	0,9827	80,5
<i>ascorbato peroxidase citosólica</i>	<i>apx1</i>	91,99	0,9738	77,2
<i>α-tubulina IV*</i>	<i>tubIII</i>	106,79	0,9168	80
<i>superóxido dismutase2*</i>	<i>sod2</i>	100,38	0,8231	79,14
<i>α-tubulina V</i>	<i>tubIV</i>	103,60	0,99	80,12
<i>glutaciona redutase1</i>	<i>gsr1</i>	92,30	0,96	75,53
<i>Zm actina</i>	<i>Zmact</i>	99,00	0,94	76,44

\*(Hermes *et al.*, no prelo)

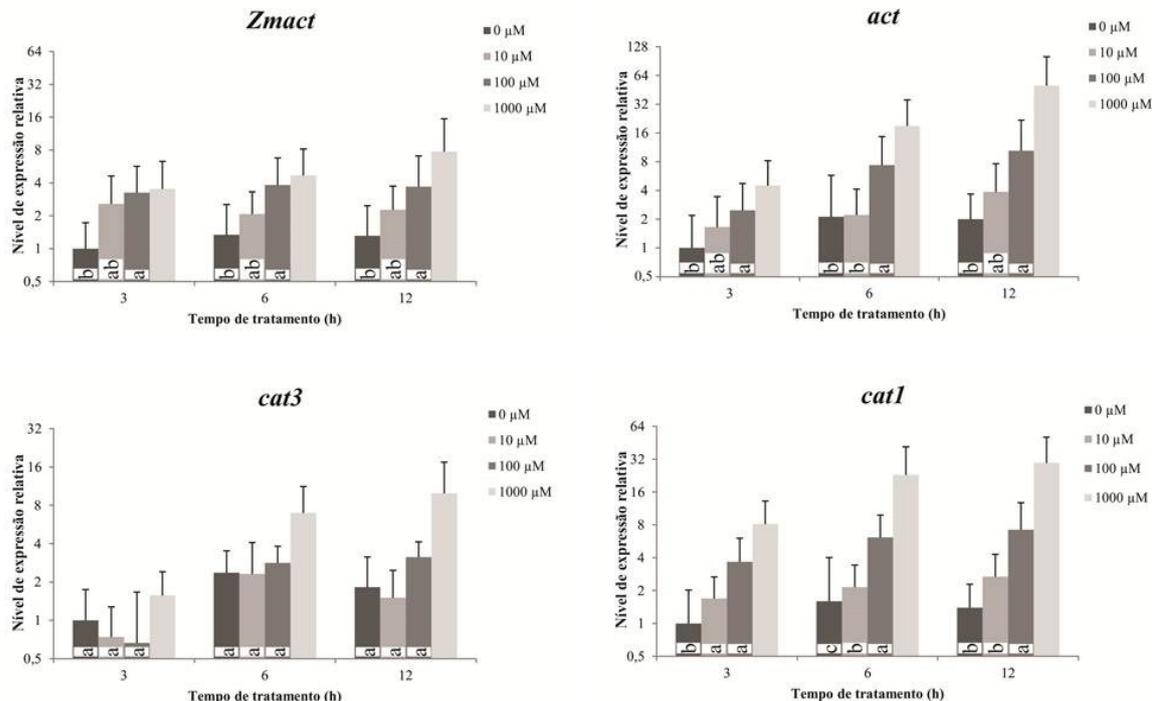


Figura 17 - Nível de expressão relativa dos genes *act*, *Zmact*, *cat1* e *cat3*, em folhas da variedade de milho p1-ww tratadas por 3, 6 e 12 horas com 0, 10, 100 ou 1000  $\mu\text{M}$  de ABA. As quantidades relativas dos transcritos foram calculadas por qRT-PCR usando o método  $\Delta\text{C}_T$  e  $\alpha\text{-tubulina}$  como gene de referência. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 18$ . Letras iguais indicam que não existem diferenças significativas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com  $\alpha = 0,01$ . Testes realizados de forma independente para cada tempo de tratamento.

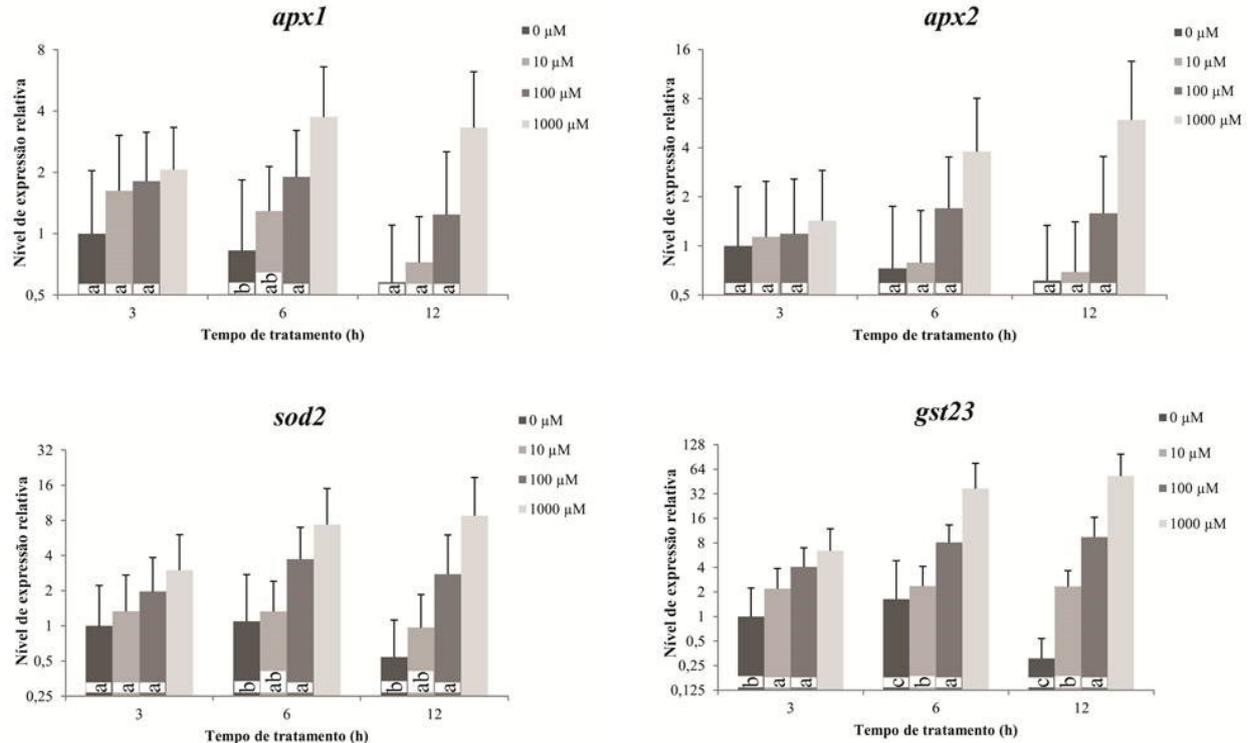


Figura 18 - Nível de expressão relativa dos genes *apx1*, *apx2*, *sod2* e *gst23* em folhas da variedade de milho p1-ww tratadas por 3, 6 e 12 horas com 0, 10, 100 ou 1000  $\mu\text{M}$  de ABA. As quantidades relativas dos transcritos foram calculadas por qRT-PCR usando o método  $\Delta\text{C}_T$  e  $\alpha\text{-tubulina}$  como gene de referência. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 18$ . Letras iguais indicam que não existem diferenças significativas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com  $\alpha = 0,01$ . Testes realizados de forma independente para cada tempo de tratamento.

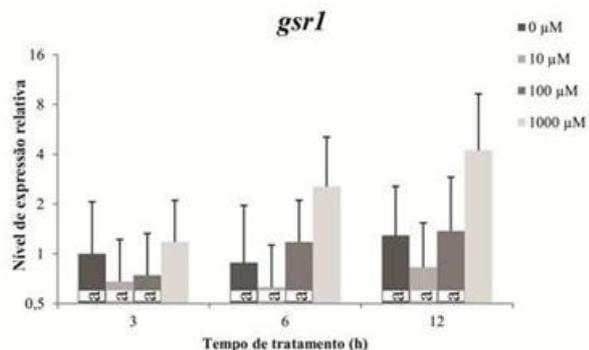
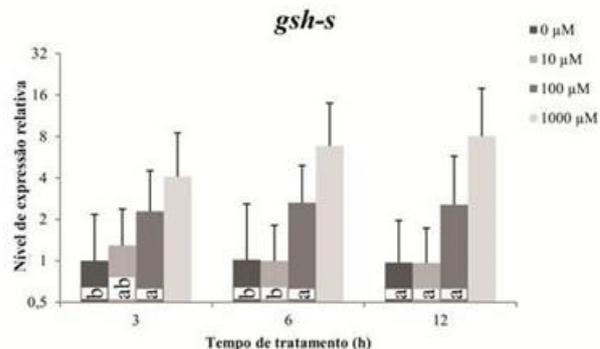
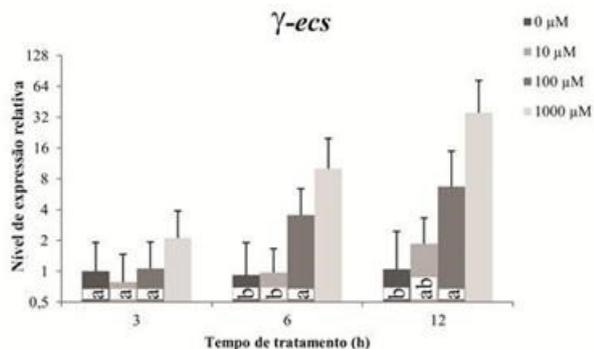


Figura 19 - Nível de expressão relativa dos genes  *$\gamma$ -ecs*, *gsh-s* e *gsr1* em folhas da variedade de milho p1-ww tratadas por 3, 6 e 12 horas com 0, 10, 100 ou 1000  $\mu$ M de ABA. As quantidades relativas dos transcritos foram calculadas por qRT-PCR usando o método  $\Delta C_T$  e  *$\alpha$ -tubulina* como gene de referência. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 18$ . Letras iguais indicam que não existem diferenças significativas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com  $\alpha = 0,01$ . Testes realizados de forma independente para cada tempo de tratamento.

No que se refere aos níveis de transcritos dos genes de catalase (figura 17) analisados, primeiramente com relação ao gene *cat1*, em 3 horas de tratamento, foi possível observar um aumento em relação às amostras controle tanto nas folhas tratadas com 10  $\mu\text{M}$  de ABA (1,7 vezes), quanto para 100  $\mu\text{M}$  de ABA (3,7 vezes). Para 6 horas, houve aumento nos níveis de transcritos da água para 10  $\mu\text{M}$  (1,4 vezes), e de 3,8 vezes do controle para 100  $\mu\text{M}$ . Em 12 horas, os níveis de transcritos aumentaram da água para 100  $\mu\text{M}$  de ABA (5,1 vezes) Já quanto aos níveis de transcritos do gene *cat3*, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos para nenhum dos tempos analisados.

Os níveis de transcritos de dois genes de ascorbato peroxidase foram analisados, *apx1* e *apx2* (figura 18), sendo que não foram encontradas diferenças significativas na sua expressão, exceto para os níveis de transcritos do gene *apx1* no tempo de 6 horas. Nesse caso, a expressão aumentou 2,4 vezes de amostras água para as amostras tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de ABA (de 0,8 da água para 1,9 da solução de ABA).

Quanto aos níveis de transcritos observados para o gene *sod2* (figura 18), em 3 horas não foi verificada diferença entre os tratamentos. Porém, diferenças foram observadas após 6 e 12 horas de tratamento. Foi observado aumento para amostras tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de ABA em relação ao controle de 3,4 vezes (6 horas) e 5,6 vezes (12 horas, nesse caso variando de 0,5 para 2,8).

Os níveis de transcritos dos genes responsáveis pela síntese de glutationa também foram analisados (figura 19). Para o gene  *$\gamma$ -ecs*, após 3 horas, não houve diferença entre os tratamentos. Em 6 horas, de 100  $\mu\text{M}$  de ABA em relação ao controle (água) houve um aumento de 3,8 vezes. Nas 12 horas, foi observado aumento de 6,7 vezes na expressão de  *$\gamma$ -ecs* na presença do ABA 100  $\mu\text{M}$  em relação ao controle (água) 12 horas.

No caso do gene *gsh-s*, em 3 horas, foi observado aumento na expressão da amostra tratada com ABA 100  $\mu\text{M}$  para a amostra controle de 2,3 vezes. Após 6 horas houve aumento nos níveis de transcritos da água para 100  $\mu\text{M}$  (2,6 vezes). Após 12 horas não foram detectadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos para o gene *gsh-s*.

Na quantificação dos níveis de transcritos do gene *gst23*, para 3 horas os valores encontrados foram 1, 2,2 e 4,1 para 0, 10 e 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Para 6 horas os valores foram 1,6 (controle), 2,4 (10

$\mu\text{M}$ ) e 8,1 (100  $\mu\text{M}$ ). No entanto, para 12 horas os valores foram, respectivamente, 0,3, 2,3 e 9,4 para 0, 10 e 100  $\mu\text{M}$ .

Para a quantificação de transcritos do gene da *gsr1* não houve diferenças entre os tratamentos em 3, 6 ou 12 horas (figura 19).

## 5.5 DETECÇÃO HISTOQUÍMICA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Na tentativa de se observar a formação do peróxido de hidrogênio em plântulas de milho em resposta ao ABA conforme descrito anteriormente (Zhang *et al.*, 2006), foram testadas algumas variações do método da visualização do peróxido com o uso do DAB como substrato. Os resultados dos experimentos DAB1, DAB2, DAB3, DAB4 e DAB5 podem ser visualizados nas figuras 20 e 21. Pode-se observar que não foi possível verificar diferenças na marcação do peróxido de hidrogênio entre as folhas das plântulas tratadas e controles pelo método utilizado em nenhuma das tentativas realizadas. As folhas expostas à água apresentaram coloração marrom de intensidade semelhante a das folhas tratadas com ABA. Este resultado difere de trabalho anterior, no qual as amostras de folhas de milho apresentaram coloração marrom após o tratamento com ABA e as amostras controle não apresentaram coloração (Zhang *et al.*, 2006).

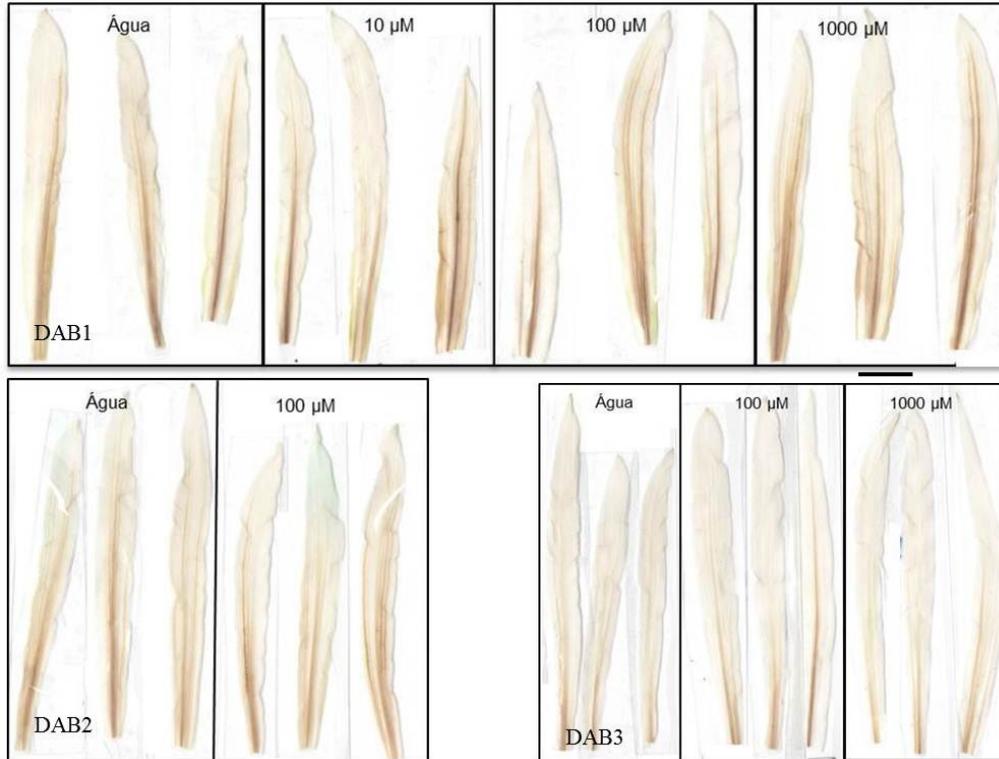


Figura 20 - Análise da produção de peróxido de hidrogênio, coloração por DAB, em folhas de plântulas de milho. DAB1 - Tratamentos: água, 10, 100 ou 1000  $\mu\text{M}$  de ABA, 3 horas. DAB2 - Tratamentos: água, 100  $\mu\text{M}$  de ABA, 3 horas. DAB3 - Tratamentos: água ou 100  $\mu\text{M}$  de ABA, 3 horas.

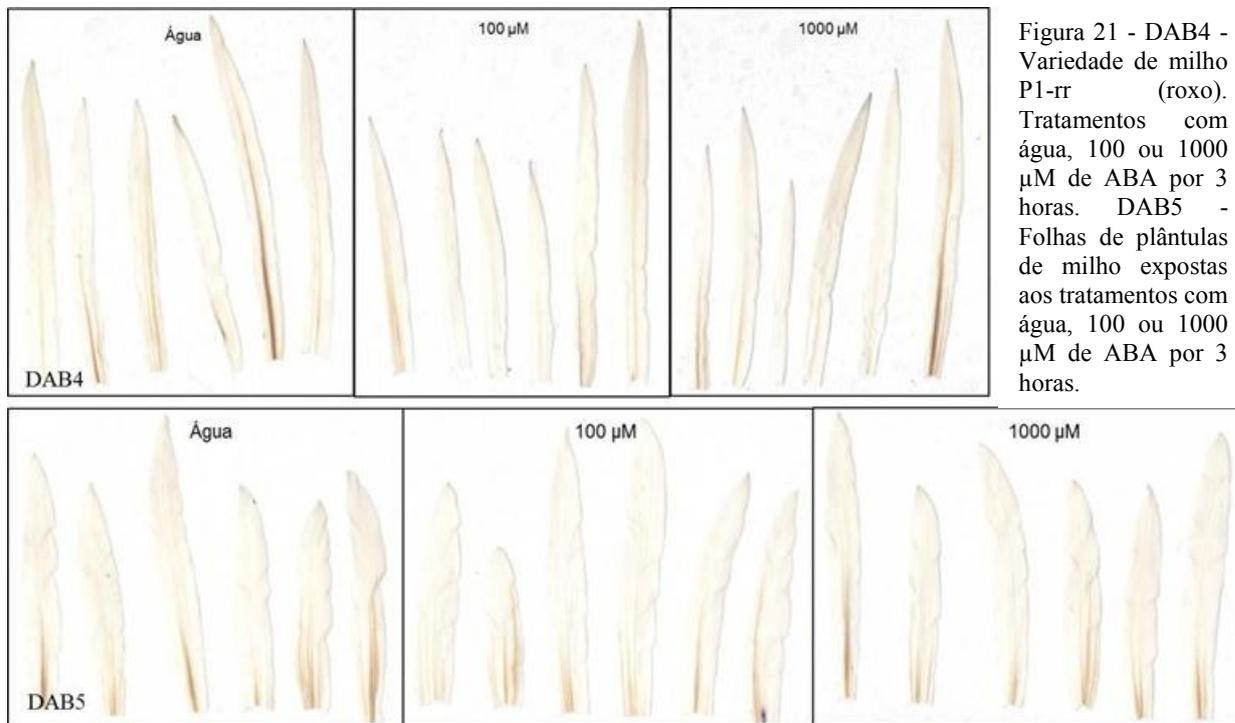


Figura 21 - DAB4 - Variedade de milho P1-rr (roxo). Tratamentos com água, 100 ou 1000 µM de ABA por 3 horas. DAB5 - Folhas de plântulas de milho expostas aos tratamentos com água, 100 ou 1000 µM de ABA por 3 horas.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA ANTIOXIDANTE EM PLÂNTULAS DE MILHO POR qRT-PCR

Os níveis de expressão de genes variam de acordo com algumas condições como, por exemplo, sua posição dentro do ciclo celular ou mediante exposição a drogas, hormônios ou outros estímulos. Sendo assim, a análise de expressão gênica requer que a medida de sequências alvo de mRNA seja realizada de forma sensível, precisa e reprodutível. Uma das formas de se realizar essa quantificação é através da combinação da transcrição reversa com a reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), a qual se constitui numa metodologia sensível uma vez que amplifica exponencialmente pequenas quantidades de ácido nucleico. Essa sensibilidade permite a detecção de mRNAs raros ou uso de pequenas quantidades de tecido (Schmittgen *et al.*, 2000).

Após a escolha dos genes a serem incluídos nas análises em um experimento de qRT-PCR, é necessário que se efetue a titulação dos iniciadores no intuito de que se obtenha a combinação de concentrações (*forward/reverse*) mais adequada. Nesse caso, analisando-se as curvas de amplificação e *melting*, torna-se necessário que se evite a formação de dímeros, e como se espera a amplificação apenas do fragmento desejado, iniciadores que apresentem curvas de *melting* com dois picos devem ser sempre rejeitados de um experimento de qRT-PCR. Também é desejável que entre as triplicatas técnicas exista uniformidade, devendo estar de preferência, sobrepostas. Outro ponto a ser considerado é o valor do Ct, que deve ser baixo, indicando maior quantidade de produto da PCR (*amplicon*) (Schmittgen e Livak 2008). Na titulação dos iniciadores realizada no presente trabalho houve o cuidado para que tais observações fossem contempladas.

Muitas variáveis devem ser controladas num experimento de análise de expressão gênica, como por exemplo, a quantidade de material inicial, eficiência enzimática e diferenças entre tecidos ou células em total atividade transcricional. Muitas estratégias têm sido utilizadas para normalizar tais variações, sendo a mais utilizada delas o uso de genes de referência, ou controle interno. A expressão deste gene não deve variar nos tecidos e células sob investigação, ou em resposta ao tratamento experimental (Vandesompele *et al.*, 2002).

Genes envolvidos em processos celulares básicos, como os mantenedores da estrutura celular ou envolvidos no metabolismo

primário, são geralmente escolhidos como normalizadores. Porém, os níveis de transcritos desses possíveis genes de referência nem sempre são estáveis e seu uso sistemático sem validação prévia pode levar à interpretação errônea dos resultados. Ainda, não existe um gene de referência confiável para ser universal e que sirva para todos os experimentos e materiais biológicos. Então, a identificação de genes de referência deve ser feita para cada espécie e condição experimental (Almeida *et al.*, 2010; Gutierrez *et al.*, 2008). Para a produção de resultados apurados e confiáveis num experimento de qRT-PCR, a validação de genes de referência, portanto, deve ser componente integral das análises (Guenin *et al.*, 2009).

No presente estudo, buscou-se o gene de expressão mais constante entre 3 candidatos a gene de referência (*tub*, *act* e *Zmact*). Nenhum deles apresentou uma expressão constante frente aos tratamentos com todas as concentrações de ABA aplicadas às plântulas de milho (figura 12). Porém, com relação ao gene *tub*, através de análises estatísticas, houve possibilidade de reunião dos grupos controle e tratados com 10 e 100  $\mu$ M de ABA. Dessa forma, foi realizada a quantificação dos transcritos dos genes alvo de forma mais apurada e confiável. Além disso, optou-se por utilizar o nível de significância de 99%, havendo apenas 1% de chance de erro nos testes estatísticos realizados, o que aumenta a confiabilidade dos resultados obtidos (figura 13).

Tem sido proposto que se realize o cálculo de um fator de normalização baseado em múltiplos controles internos para a realização de uma normalização mais apurada e confiável dos dados de expressão gênica (Vandesompele *et al.*, 2002). Estudos têm sido realizados com a normalização de seus dados de expressão gênica dessa forma (Hachez *et al.*, 2006; Parent *et al.*, 2009). No presente estudo, no entanto, foi realizada a tentativa de se obter um padrão de expressão mais homogêneo pelo cálculo da média geométrica entre *tub* e *Zmact*, porém, pelo resultado obtido (figura 12), optou-se pela não utilização desse novo valor normalizador uma vez que seu padrão de expressão foi muito variado. Esse resultado pode ter ocorrido devido à ampla variação de expressão da *Zmact*. Se houvesse outro gene com expressão mais constante frente aos tratamentos, tal normalização entre médias poderia resultar em um fator normalizador mais homogêneo.

No que se refere à validação de genes, para que fosse utilizado o método do Ct comparativo para as análises de quantificação relativa dos transcritos alvo, foram geradas curvas-padrão com amostra controle diluída de forma seriada tanto para genes alvo quanto para o gene de

referência. Nesse caso, para cada curva-padrão foram calculados valores de eficiência, a partir da equação  $m = -(1/\text{Log } E)$  ou  $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ . Nesse caso, as eficiências devem estar entre 1,8 e 2,2 ou 90 e 110% para que sejam válidos os cálculos realizados por esse método. No presente estudo foram obtidos valores dentro dessa faixa (tabela 4) e assim os cálculos da quantificação relativa pelo método do Ct comparativo puderam ser realizados (Livak e Schmittgen 2001; Schmittgen e Livak, 2008).

Em seguida, foram realizadas curvas reunindo o logaritmo da diluição do cDNA versus Delta Ct (Ct gene alvo – Ct gene de referência) para cada diluição (figura 16). Pode-se afirmar que os valores obtidos nessas curvas foram satisfatórios, uma vez que é exigência para a realização da quantificação relativa dos genes alvo pelo método do Delta Ct que o valor absoluto do *slope* seja próximo à zero, o que significa que as eficiências dos genes alvo e de referência são similares (Livak e Schmittgen, 2001; Schmittgen e Livak, 2008).

Reunidos os pressupostos de validação do experimento para a eficiente realização dos cálculos dos transcritos pelo método do Ct comparativo, foram realizadas as curvas de amplificação com as amostras de cDNA extraído de folhas de milho tratadas com ABA 0, 10, 100 e 1000  $\mu\text{M}$  em triplicatas técnicas nas placas de PCR e em três experimentos independentes para os genes alvo *act*, *Zmact*,  *$\gamma$ -ecs*, *gsh-s*, *gst23*, *gsr1*, *apx1*, *apx2*, *cat1*, *cat3* e *sod2*.

Antes de serem abordados os resultados da quantificação, há que se fazer um parêntese a respeito da grande variação encontrada nas amostras que receberam o tratamento de soluções de 1000  $\mu\text{M}$  de ABA. Após as análises estatísticas, optou-se por excluir tais amostras da análise uma vez que pelo teste de Kruskal-Wallis não foi possível agrupá-los com o restante dos tratamentos, sendo estatisticamente diferente dos demais, com 99% de significância. Para tais amostras, os valores de expressão dos transcritos apresentaram valores, no geral, muito elevados, assim como elevados desvios-padrão.

Em estudo anterior (Jiang e Zhang, 2001) realizado em plântulas de milho tratadas com as mesmas concentrações empregadas no presente estudo, concluiu-se que em plântulas tratadas com solução de 1000  $\mu\text{M}$  de ABA houve geração mais elevada de superóxido de oxigênio e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , porém, as atividades das enzimas antioxidantes e os conteúdos de carotenoides e  $\alpha$ -tocoferol, apesar de mantidos em altos níveis, não foram maiores que os encontrados para o tratamento com 100  $\mu\text{M}$  de ABA, também não ocorrendo mudanças nos níveis de ascorbato e glutatona. Assim, altas concentrações de ABA induzem a

geração excessiva de ROS e levam a dano oxidativo em células de folhas de milho, ao passo que tratamentos com baixas concentrações (10 ou 100  $\mu\text{M}$ ), induzem o sistema antioxidante contra danos oxidativos (Jiang e Zhang, 2001). Tal resultado pode fornecer pistas da causa do comportamento encontrado para os transcritos dos genes do presente estudo frente à alta concentração de ABA. Não se pode chegar a conclusões definitivas com respeito a esse fato apenas através dessa informação, mas no mínimo é possível supor que as células estavam sofrendo de grande estresse.

Pesquisas relatam o uso dos transcritos de actina como genes de controle interno em experimentos com aplicação de tratamento de ABA em milho por PCR convencional (Hu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006), porém no presente trabalho, os dois genes de actina (*act* e *Zmact*) apresentaram variações consideráveis frente aos tratamentos com o hormônio. Sendo dois genes diferentes (Soderlund *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010) é interessante notar que ambos mostraram uma amplitude de variação em suas expressões relativas bastante distintas. Desconsiderando-se as concentrações de 1000  $\mu\text{M}$  de ABA, enquanto que o gene da *act* mostra padrões de variações que vão de 1 a 10,4, os transcritos do gene *Zmact* mostraram amplitude menor (de 1 a 3,7 vezes). Para efeito de comparação, ao considerarmos a maior concentração de ABA, os valores extremos passam a ser de 50,2 (*act*) e 7,8 (*Zmact*). É interessante salientar que o gene da actina têm mostrado variações frente a diferentes condições experimentais entre diferentes espécies animais e vegetais (Bas *et al.*, 2004; Czechowski *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2002; Radonić *et al.*, 2004; Schmittgen e Zakrajsek, 2000).

Trabalhos realizados com a planta *Commelina communis* mostraram que em células-guarda de estômatos abertos sob a luz do dia, filamentos longos de actina são arranjados no córtex da célula e irradiam a partir do poro estomático. Quando em contato com o ABA, que se constitui num sinal para o fechamento estomático, é induzida a rápida despolarização dos filamentos de actina corticais, havendo a formação de um novo tipo de filamento de actina, randomicamente orientados através da célula. Explica-se que as mudanças na actina induzidas pelo ABA nas células-guarda da planta sejam mediadas pelos níveis de cálcio citosólico, que age como um sinal mediador na reorganização da actina, bem como devido às atividades das proteínas kinases e fosfatases que participam da remodelagem da actina nessas células durante o fechamento estomático induzido pelo ABA (Eun e Lee, 1997; Hwang e Lee, 2001).

Em relação aos genes envolvidos no sistema antioxidante, nesse estudo, foram encontradas variações nas respostas a diferentes concentrações de ABA para os transcritos do gene *cat1* enquanto que não foram encontradas diferenças significativas entre os transcritos do gene *cat3*.

Foi demonstrado que tratamento com ABA induz a expressão do sistema antioxidante, sendo reportado aumento na atividade enzimática de catalases total (Jiang e Zhang, 2002; Zhang *et al.*, 2006; Jiang e Zhang, 2001), bem como aumento na expressão do gene *cat1* em folhas de milho (Zhang *et al.*, 2006), o que está em concordância com os resultados do presente estudo.

Em estudo com embriões de milho, também foi demonstrado que cada catalase responde de forma diferente ao ABA aplicado de forma exógena (Williamson e Scandalios, 1992), assim, enquanto os níveis de atividade enzimática e transcritos *cat1* aumentaram de forma rápida, os níveis de transcritos *cat3* permaneceram inalterados. Embora as 3 catalases convertam o  $H_2O_2$  em moléculas menos tóxicas, as 3 isozimas de milho são bastante diferentes. As regiões promotoras de cada gene *cat* contêm múltiplos elementos controle, que variam em número e combinação, o que resulta num complexo e multifacetado padrão de resposta único para cada CAT. Além do padrão de expressão diferenciado, as catalases também exibem diferenças bioquímicas entre si, podendo catalisar a dismutação direta do  $H_2O_2$  ou usar essa ROS para oxidar substratos tais como metanol, formaldeído e nitrito, nesse caso através do modo de ação de peroxidação (Williamson e Scandalios, 1992). Sendo classificadas em monofuncionais (que realizam a dismutação) ou bifuncionais (com atividade de dismutação e peroxidação), sugere-se que as últimas sejam encontradas em procariotos e eucariotos inferiores, como fungos e protistas, sendo as primeiras encontradas nos demais eucariotos. Porém, mesmo catalases monofuncionais podem realizar a catálise da peroxidação dependente de  $H_2O_2$  de pequenas moléculas orgânicas, como o etanol (Mhamdi; Noctor; Baker, 2012).

Outra pesquisa avaliou o acúmulo de transcritos em resposta ao tratamento com ABA por até 24 horas em luz constante. Dessa vez, novamente, com relação ao nível de transcritos de *cat1*, houve um aumento significativo em resposta ao ABA após 4 horas de tratamento, sendo níveis máximos atingidos depois de 12 e 24 horas de tratamento. Por outro lado, os níveis de transcritos do gene *cat3* diminuíram após 4, 8, 12 e 24 horas de tratamento. O mesmo estudo avaliou o acúmulo de transcritos *cat*, a atividade total enzimática e cada isozima em resposta

ao ABA durante vários estágios da embriogênese e germinação, concluindo que cada transcrito *cat* responde de forma diferente ao ABA em cada estágio de desenvolvimento examinado (Guan e Scandalios, 1998a).

Pode-se pensar que, se formas bioquimicamente distintas de uma enzima localizam-se em compartimentos e tipos celulares específicos, a função de cada isozima está correlacionada com o processo metabólico daquele compartimento (Williamson e Scandalios 1992). Recentemente sugeriu-se que os principais fatores capazes de distinguir a função dos produtos dos 3 genes são a localização e o momento em que eles são expressos ao invés de diferenças bioquímicas entre eles e seus produtos (Mhamdi; Noctor; Baker, 2012).

As catalases de plantas, sendo codificadas por apenas 3 genes aparentam falsa simplicidade. O conhecimento sobre a função das catalases vegetais ainda é obscurecido por incertezas. Questões não resolvidas incluem as funções fisiológicas específicas das diferentes isoformas da enzima, a distribuição subcelular das catalases e os mecanismos que determinam tal distribuição, além do verdadeiro significado biológico dessas enzimas. O que se sabe é que apenas o gene da *cat2* tem função indispensável para condições de crescimento em condições nas quais a fotorrespiração é relativamente ativa. As funções das outras duas catalases ainda não foram esclarecidas (Mhamdi; Noctor; Baker, 2012).

Com respeito às funções das catalases, além do controle que opera no nível de expressão gênica transcricional, pode haver também controle da abundância de proteína sendo regulada pós-transcricionalmente (Mhamdi; Noctor; Baker, 2012).

Em relação às respostas encontradas para os transcritos das enzimas APX, ambas citosólicas (Alexandrov *et al.*, 2009; Van Breusegem *et al.*, 1995), no geral, não houve diferenças significativas, exceto para o tempo de 6 horas o gene *apx1*, apresentou incremento na transcrição das amostras controle para as tratadas com 100  $\mu$ M de ABA. Uma importante característica de tais enzimas consiste na sua instabilidade na ausência de ascorbato, uma vez que concentrações celulares menores que 20  $\mu$ M de ascorbato acarretam numa rápida perda de atividade dessas enzimas (Shigeoka *et al.*, 2002).

Estudos anteriores de ensaio enzimático determinaram aumento na atividade total de APX em resposta ao ABA 100  $\mu$ M por 12 horas em folhas de plântulas de milho (Jiang e Zhang, 2002; Jiang e Zhang, 2001). Em ensaios enzimáticos e de quantificação de transcritos por PCR convencional, foram reportados aumentos na atividade enzimática,

bem como no nível de transcritos de gene de uma APX citosólica em folhas de plântulas de milho tratadas por 12 horas com ABA 100  $\mu\text{M}$  (Hu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006). Ainda em tratamento com a mesma concentração de ABA, por 24 horas, houve aumento na atividade total de APX em folhas de plântulas de milho (Hu *et al.*, 2005).

Recentemente foi utilizada a parte aérea do milho para realizar a análise dos transcritos de 8 genes da família APX, sendo que 6 apresentaram aumentos na expressão devido a tratamento com 100  $\mu\text{M}$  de ABA, enquanto que os outros 2 não foram afetados, desses, um mitocondrial e um peroxissomal. Porém, os genes expressos no citosol mostraram expressão diferencial com relação ao ABA. Quanto à atividade enzimática total APX, no mesmo estudo, foi relatado aumento em 3 horas de tratamento, diminuição em 6 horas e após, novamente aumento em 12 horas. Os autores sugerem que as respostas reduzidas de alguns genes frente ao tratamento com ABA na parte aérea de plantas de milho deve se dar em função do padrão de expressão temporal desses genes. Ainda, se o gene não respondeu ao estresse a que foi submetido, poderá responder à combinação de mais de um estresse. Além de tudo, genes pertencentes à mesma família gênica podem desempenhar diferentes papéis (Liu *et al.*, 2012). Os resultados obtidos em estudos prévios estão parcialmente de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pois, os transcritos dos dois genes *apx* analisados tiveram resultados opostos no tempo de tratamento de 6 horas das amostras tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de ABA em relação aos controles.

No que se refere às respostas encontradas para o gene *sod2*, no tempo de 3 horas não houve resposta dos tratamentos, havendo, no entanto, variações das amostras controle para tratadas com a concentração mais elevada de ABA para 6 e 12 horas, sendo a resposta maior no maior tempo analisado. Foi determinado anteriormente (Jiang e Zhang, 2001), em segmentos de folhas de plântulas de milho tratadas em soluções de ABA 100  $\mu\text{M}$ , aumento na atividade total da enzima SOD no curso de 24 horas, sendo que variações começaram a ser significativas após 8 horas de tratamento. Tais resultados estão por um lado, de acordo com os resultados dos transcritos do presente estudo uma vez que em 3 horas não foram apontadas diferenças significativas entre as amostras controle e tratadas. Porém, no estudo anterior, as respostas enzimáticas começaram a ser significativas após 8 horas, enquanto que no presente estudo já houve diferença em 6 horas. Releva notar que ensaios que fazem dosagem de atividade enzimática total, são diferentes de ensaios de quantificação de transcritos, os quais apontam para a dosagem de apenas um produto gênico, tal diferença entre ensaios

pode apontar pistas das diferenças entre os resultados obtidos. Vale lembrar que em milho são encontradas pelo menos 9 isozimas SODs (Guan e Scandalios, 1998b).

Resultados de aumento de atividade enzimática SOD foram encontrados após 12 horas de tratamento com ABA (Hu *et al.*, 2005; Jiang e Zhang 2002). Foi demonstrado que tratamento com o hormônio causava acréscimo na atividade enzimática SOD, observando que a atividade enzimática antioxidante no geral atingia valores máximos após 12 horas de tratamento com ABA, enquanto níveis máximos de transcritos do sistema antioxidante ocorriam em 8 horas de tratamento (Zhang *et al.*, 2006). O tratamento com ABA resultou em aumento na atividade enzimática SOD e de transcritos (*sod4*) em plântulas de milho (Hu *et al.*, 2007). Assim, resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo foram reportados anteriormente, porém utilizando outras metodologias.

Quanto aos níveis de transcritos dos genes que codificam enzimas envolvidas na rota de biossíntese da GSH, o primeiro deles,  $\gamma$ -*ecs*, não apresentou diferenças nas 3 horas de tratamento com ABA, havendo diferenças dose-dependente nas 6 horas, porém, o aumento mais significativo ocorreu nas 12 horas de tratamento. No que diz respeito ao gene *gsh-s*, em 3 horas houve aumento com 100  $\mu$ M de ABA, em 6 horas. Em estudo anterior, após tratamento com ABA 10, 100 e 1000  $\mu$ M em plântulas de milho, o conteúdo de GSH aumentou em 12 horas para a concentração intermediária do hormônio, e em 24 horas, quantidades mais altas tanto para 10  $\mu$ M quanto de 100  $\mu$ M de ABA se comparadas com amostras controle (Jiang e Zhang, 2001). Porém, outro estudo apontou apenas para um aumento discreto na concentração da GSH em parte aérea de milho tratada com concentração de 100  $\mu$ M de ABA por 3 horas (Liu *et al.*, 2012).

Diferentes respostas ao ABA no teor de GSH em diferentes genótipos de milho foram observados. Assim, cada genótipo, com seu sistema redox diferenciado, pode desencadear diferentes sistemas de sinalização conforme o estresse ao qual é submetido (Kocsy *et al.*, 2004). Outro trabalho, testando os efeitos dos hormônios de estresse, ABA e ácido salicílico, bem como de estresses abióticos, como estresse salino, osmótico, por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou condições de cultivo em ausência de luz, sob as quantidades de ROS e antioxidantes em duas linhagens de milho com diferentes tolerâncias a estresse, percebeu-se que conforme o estresse aplicado pode haver um aumento ou uma diminuição de GSH, além de mudanças nos níveis de antioxidantes entre os dois genótipos.

Isso indica que a resposta da planta ao estresse é dependente da tolerância do próprio genótipo (Kellös *et al.*, 2008).

No que se refere às respostas para os transcritos do gene *gst23*, houve aumento significativo tempo e dose-dependentes para 3, 6 e 12 horas, sendo que aumento de 31,3 vezes foi encontrado no tempo de 12 horas da amostra controle para a tratada com 100  $\mu$ M de ABA. Trabalho prévio apontou para diferenças na atividade enzimática GST, após tratamento com ABA, de acordo com o genótipo de milho. Nesse caso, a variedade tolerante ao frio/seca apresentou índices maiores de GST, enquanto a variedade sensível a esses estresses não apresentou variação dessa enzima de amostras tratadas *versus* controles (Kellös *et al.*, 2008).

No presente estudo, com respeito ao gene da *grs1*, não foram identificadas mudanças nos transcritos em resposta aos tratamentos com o hormônio em nenhum dos tempos analisados. Porém, esses resultados não estão em conformidade com os resultados encontrados na literatura, pois estudos apontam para maior expressão de um gene de glutationa redutase e/ou aumento na atividade GR total em resposta a tratamento com ABA (Hu *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2007; Jiang e Zhang, 2002; Zhang *et al.*, 2006).

Em relação aos resultados da expressão de genes do sistema antioxidante em resposta ao ABA encontrados no presente estudo, torna-se possível afirmar que os genes que não apresentaram resposta frente aos tratamentos foram *cat3*, *apx2* e *grs1*. Quanto ao restante dos genes, pode-se afirmar que a variação mais frequentemente encontrada foi a de aumento na expressão dos transcritos das amostras tratadas com 100  $\mu$ M de ABA. Dessa forma, os genes *act*, *Zmact*, *cat1* e *gst23* apresentaram aumento nas 3, 6 e 12 horas. No entanto, houve aumento em 6 e 12 horas para *sod2* e  $\gamma$ -*ecs*, nas 3 e 6 horas para *gsh-s* e apenas nas 6 horas e para o transcrito de *apx1*. Já o aumento no teor de transcritos nas amostras 10  $\mu$ M ABA ocorreram para *cat1* (3 e 6 horas), *gst23* (12 horas) e *gsh-s* (6 horas). Aumentos de 10  $\mu$ M para 100  $\mu$ M de ABA ocorreram para os transcritos dos genes *act* e  $\gamma$ -*ecs* (6 horas) e para *cat1* e *gst23* (12 horas).

Há que se considerar que a variedade com a qual se realizou o presente estudo apresenta expressão diferencial de flavonoides. Sendo assim, existe a possibilidade de o seu sistema antioxidante apresentar alguma variabilidade em relação às variedades de milho cuja expressão de flavonoide não apresenta variação. Porém isso não pode ser afirmado de forma conclusiva, sendo necessários novos estudos para mais

esclarecimentos a respeito do tema, como a comparação da resposta ao ABA de folhas de milho com baixo e com alto teor de flavonoides.

## 6.2 DETECÇÃO HISTOQUÍMICA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM PLÂNTULAS DE MILHO USANDO DAB

No intuito de detectar a produção/presença do peróxido de hidrogênio, a técnica que utiliza o substrato DAB tem sido amplamente utilizada em diversas plantas, como por exemplo, em cevada (*Hordeum vulgare*) (Vanacker; Carver; Foyer, 2000), em *Arabidopsis thaliana* (Fryer *et al.*, 2003; Galletti *et al.*, 2008; Fryer *et al.*, 2002; Mullineaux; Karpinski; Baker, 2006; Xing; Xia; Zhang 2008), bétula (*Betula pendula*) (Pellinen *et al.*, 2002), em arroz (*Oryza sativa*) (Chao; Chou, Kao, 2011; Hsu e Kao, 2007), em milho (Hu *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2006; Tossi; Cassia; Lamattina, 2009; Zhang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010), entre outras.

Para efetuar a detecção de ROS em tecidos vivos é importante que a técnica a ser aplicada não perturbe o sistema de forma severa, mas que apenas indique a presença e o local de produção dessas espécies. Um dos problemas em se detectar ROS em sistemas biológicos decorre do seu tempo de vida muito curto. Conseqüentemente, as sondas que detectam ROS devem ser introduzidas perto do seu local de produção para que ela possa reagir diretamente com as ROS logo após sua produção. Além disso, em função da ampla distribuição e alta afinidade dos sistemas antioxidantes em tecidos, as sondas para detectar as ROS devem ter alta afinidade por essas moléculas para que possam competir com os sistemas de detoxificação de ROS nos tecidos (Driever *et al.*, 2009).

Argumentos desfavoráveis ao uso da técnica residem na alta toxicidade da sonda. Foi demonstrado que quando diretamente infiltrado em folhas de tabaco, não deve ser aplicada concentração maior que 0,1 mg/mL, pois altas concentrações da sonda interferem fortemente na fotossíntese, o que pode distorcer as respostas das folhas ao DAB em experimentos de estresse. Em solução de incubação, se usa frequentemente soluções de 1-2 mg/mL, porém, sendo aplicados por infiltração assistida pela transpiração, as concentrações no interior da folha são provavelmente menores. Ainda, uma vez que é necessário remover a clorofila, as folhas não podem ser usadas para detecção do peróxido de hidrogênio em tempo real (Snyrychova *et al.*, 2009). Ainda, a sonda deve ser manuseada pelo pesquisador com extremo cuidado

devido a sua alta toxicidade (Driever *et al.*, 2009), por ser uma substância possivelmente carcinogênica (Snyrychova *et al.*, 2009).

No presente estudo, a técnica foi testada de diversas formas, com o objetivo de que os resultados apresentassem similaridade com os encontrados na literatura, nos quais, no local da folha onde havia produção maior de peróxido de hidrogênio, havia coloração marrom mais marcante, resultante da reação do peróxido de hidrogênio com o DAB (Hu *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2006; Tossi; Cassia; Lamattina, 2009; Zhang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010). Porém, os resultados do presente estudo não condizem com os resultados encontrados na literatura, pois se esperava que as plantas que receberam ABA produzissem mais peróxido de hidrogênio, sendo a marcação marrom produzida de uma coloração mais intensa, se comparadas com as plantas controle. Porém, foi observado (figuras 10 a 14), que tanto as plantas que receberam o tratamento do ABA (seja na concentração de 10, 100 ou 1000  $\mu\text{M}$ ) quanto as controle apresentaram colorações semelhantes.

O DAB é dissolvido em água reduzindo o pH para 3,6 (Driever, *et al.*, 2009) ou 3,8 (Zhang *et al.*, 2006). Primeiramente prepara-se uma solução de água adicionando HCl e então adiciona-se o DAB, agitando a solução até que o DAB dissolva completamente. O DAB degrada na luz, portanto devem ser tomados cuidados para que não fique exposto. Ainda, recomenda-se que a solução seja preparada para uso imediato (Driever *et al.*, 2009). A sensibilidade do DAB à luz já foi questionada (Snyrychova *et al.*, 2009), no entanto, para o experimento, as medidas acima foram todas seguidas, não havendo razões para obter resultados diferentes dos esperados em função de falhas na técnica de uso do DAB em tais aspectos.

Uma explicação viável para a não observação de diferenças entre plântulas controle e tratadas poderia residir em possíveis equívocos na execução da técnica. No decorrer dos experimentos, versões da técnica foram realizadas no intuito de descobrir eventuais erros na execução do método. Foram modificadas algumas condições do ensaio que, muitas vezes, não estão explícitas de forma clara na descrição do procedimento nos artigos disponíveis. O uso de água destilada, a permanência das plântulas no DAB até o fim dos tratamentos, a diminuição da intensidade luminosa durante a permanência das plântulas no DAB, a permanência das plantas por 5 horas no DAB e o ajuste do pH da solução de DAB foram mudanças importantes mas que não foram suficientes para o total aperfeiçoamento do método, de forma que não foi possível realizar a detecção de diferenças da marcação de produção

de peróxido de hidrogênio entre plântulas de milho controle e tratadas com ABA.

Ao se observar o aspecto das folhas no geral, desde a primeira tentativa (DAB1, figura 20) até a última (DAB5, figura 21), nota-se um “clareamento gradual”, sendo que as folhas das primeiras tentativas apresentam coloração mais escura se comparadas com as últimas. Isso pode revelar que as mudanças na aplicação da metodologia foram válidas no sentido de que nos últimos experimentos, as folhas podem ter sofrido um estresse menor se comparadas com as folhas dos primeiros ensaios (fora o efeito do ABA, pois os tratamentos, embora variando a concentração, foram sempre com esse hormônio).

O experimento foi realizado, no geral com o milho variedade P1 ww, porém, para verificar se os resultados que estavam sendo obtidos eram devidos a uma possível resposta específica da variedade p1-ww (que apresenta baixa expressão de flavonoides), foi realizada uma tentativa de aplicar a metodologia em outra variedade de milho, P1-rr, que por sua vez, possui expressão aumentada desses compostos. Porém, como relatado, o resultado foi similar ao observado para variedade P1 ww (figura 21).

No entanto, a coloração semelhante das plântulas controle e tratadas também pode indicar que os tratamentos não estavam sendo efetivos no intuito de produzir maior quantidade de peróxido de hidrogênio nas plântulas tratadas, porém foi demonstrado que o tratamento com ABA induz a geração de peróxido de hidrogênio em folhas de plântulas de milho segmentadas colocadas nas soluções com ABA (Jiang e Zhang, 2001). Também foi demonstrado que não só o ABA exógeno, mas também o ABA endógeno se constitui em fonte de geração de peróxido de hidrogênio em folhas de milho, nesse caso sujeitas a estresse hídrico (Hu *et al.*, 2006). Também se verificou a formação de peróxido de hidrogênio em decorrência do ABA em culturas de células de tabaco (Hao *et al.*, 2008).

Além disso, existem outras técnicas para efetuar a detecção do peróxido de hidrogênio *in vivo* que podem ser empregadas em estudos futuros, tais como ensaio enzimático (Okuda *et al.*, 1991; Ngo e Lenhoff, 1980).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A partir da realização desse estudo foi possível realizar a padronização do ensaio de quantificação de transcritos por qRT-PCR após tratamento com ABA em milho dos genes *cat1*, *cat3*, *apx1*, *apx2* e *sod2*. Ainda, foram testados 3 genes de referência candidatos (*act*, *Zmact* e *tub*) e entre eles, a *tub* mostrou-se mais adequada às condições experimentais.

Por meio do presente estudo foi realizada a análise da expressão de genes do sistema antioxidante, fazendo o uso de qRT-PCR, em p1-ww, variedade de milho com baixa expressão de flavonoides, frente a tratamentos com concentrações crescentes de ABA. Não houve mudança após tratamento com ABA na expressão de 3 dos 9 genes analisados (*cat3*, *apx2*, *grs1*), no entanto, houve aumento nos níveis de transcritos dos demais genes (*cat1*, *apx1*, *sod2*, *γ-ecs*, *gsh-s* e *gst23*).

O aumento observado, em uma variedade de milho com expressão diminuída de flavonoide, na expressão de seis genes envolvidos no sistema antioxidante em resposta ao tratamento das folhas com 100 μM de ABA, confirma que o ABA age como mediador do sistema antioxidante da célula vegetal.

O presente estudo serve de base para a realização de futuros estudos sobre a resposta ao ABA de folhas de milho com concentração modificada de flavonoides. Para dar continuidade à pesquisa, torna-se interessante realizar o mesmo ensaio utilizando a variedade de milho com características opostas à utilizada nesse estudo, ou seja, a variedade P1-rr, que possui expressão aumentada de flavonoides. Assim, seria possível estabelecer uma possível relação/comparação entre os resultados obtidos até então referentes à variedade p1-ww, com os resultados da expressão de genes do sistema antioxidante em resposta ao ABA da variedade P1-rr.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGATI, G. et al. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67-76, 2012.
- AHMAD, P. et al. Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as Signaling Molecule in Plants. In: (Ed.). **Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change**: Springer New York, 2012. p.361-380.
- AHMAD, P.; SARWAT, M.; SHARMA, S. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and Signaling in Plants. **Journal of Plant Biology**, v. 51, n. 3, p. 167-173, 2008.
- ALEXANDROV, N. et al. Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing. **Plant Molecular Biology**, v. 69, n. 1-2, p. 179-194, 2009.
- ALMEIDA, M. R. et al. Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during in vitro adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill. **BMC Molecular Biology**, v. 11, p. 73, 2010.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-99, 2004.
- BAS, A. et al. Utility of the Housekeeping Genes 18S rRNA,  $\beta$ -Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 59, n. 6, p. 566-573, 2004.
- BEUTLER, E. Nutricional and Metabolic Aspects of Glutathione. **Annual Review of Nutrition**, v. 9, p. 287-302, 1989.

- BIENERT, G. P.; SCHJOERRING, J. K.; JAHN, T. P. Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1758, n. 8, p. 994-1003, 2006.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169-93, 2000.
- BUSTIN, S. A. Why the need for qPCR publication guidelines?—The case for MIQE. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 217-226, 2010.
- CANNON, R. E; WHITE, J. A; SCANDALIOS, J. G. Cloning of eDNA for maize superoxide dismutase 2 (SOD2). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, p. 179-183, 1987.
- CHANDLER, V. L.; STAM, M.; SIDORENKO, L. V. Long-distance cis and trans interactions mediate paramutation. **Advances in Genetics**, v. 46, p. 215-34, 2002.
- CHAO, Y.-Y.; CHOU, T.-S.; KAO, C. H. Involvement of abscisic acid and hydrogen peroxide in regulating the activities of antioxidant enzymes in leaves of rice seedlings under magnesium deficiency. **Plant Growth Regulation**, v. 66, n. 1, p. 1-8, 2011.
- CHEN, K.; FESSEHAIE, A.; ARORA, R. Selection of Reference Genes for Normalizing Gene Expression During Seed Priming and Germination Using qPCR in *Zea mays* and *Spinacia oleracea*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, n. 2, p. 478-487, 2012.
- CIKOS, S.; BUKOVSKA, A.; KOPPEL, J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. **Bmc Molecular Biology**, v. 8, 2007.
- COE, E. H. The properties, origin, and mechanism of conversion-type inheritance at the B locus in maize. **Genetics**, v. 53, n. 6, p. 1035-63, 1966.
- COE, E. The origins of maize genetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 11, p. 898-905, 2001.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em 11, nov. 2012.

CZECHOWSKI, T. et al. Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 139, n. 1, p. 5-17, 2005.

DALTON, T. P.; SHERTZER, H.G; PUGA, A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, p. 67–101, 1999.

DAVIES, P. J. **The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions**. Plant Hormones: Springer Netherlands, 2010. p.1-15.

DRIEVER, S. M. et al. Imaging of Reactive Oxygen Species In Vivo. In: PFANNSCHMIDT, T. (Ed.). **Plant Signal Transduction: Methods and Protocols**. New York: Humana Press, v.479, 2009. p.109-116.

EHLERINGER, J. R.; CERLING, T. E.; HELLIKER, B. R.. C4 photosynthesis, atmospheric CO<sub>2</sub>, and climate. **Oecologia**, v. 112, p. 285-299, 1997.

EUN, S.; LEE, Y. Actin filaments of guard cells are reorganized in response to light and abscisic acid. **Plant Physiology**, v. 115, n. 4, p. 1491-1498, 1997.

FASOLI, E. et al. Searching for allergens in maize kernels via proteomic tools. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 3, p. 501-10, 2009.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. **Plant Physiology**, v. 155, n. 1, p. 2-18, 2011.

FOYER, C. H; THEODOULOU, F. L; DELROT, S. The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 10, p. 486-492, 2001.

FRYER, M. J. et al.. Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1249–1254, 2002.

FRYER, M.J. et al. Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress

reveals a functional organisation of Arabidopsis leaves. **Plant Journal**, v. 33, n. 4, p. 691-705, 2003.

FURKANK. A. W. C.; TAYLOR, R. T. Regulation of Photosynthesis in C3 and C4 Plants: A Molecular Approach. **The Plant Cell**, v. 7, p. 797-807, 1995.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 402, p. 1445-54, 2004.

GALLETTI, R. et al. The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in Arabidopsis is dispensable for the activation of defense responses effective against Botrytis cinerea. **Plant Physiology**, v. 148, n. 3, p. 1695-706, 2008.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GINZINGER, D. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 6, p. 503-512, 2002.

GOETTEL, W.; MESSING, J. Change of Gene Structure and Function by Non-Homologous End-Joining, Homologous Recombination, and Transposition of DNA. **Plos Genetics**, v. 5, n. 6, 2009.

GONDIM, A. F., et al. Pretreatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in maize seeds: effects on germination and seedling acclimation to salt stress. **Brazilian Society of Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 103-112, 2010.

GOWIK, U.; WESTHOFF, P. The path from C3 to C4 photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 155, n. 1, p. 56-63, 2011.

GROTEWOLD, E., et al. Engineering Secondary Metabolism in Maize Cells by Ectopic Expression of Transcription Factors. **The Plant Cell**, v. 10, p. 721-740, 1998.

GROTEWOLD, E.; BOWEN, B. J. D. B.; PETERSON, T. The myb-Homologous P Gene Controls Phlobaphene Pigmentation in Maize

Floral Organs by Directly Activating a Flavonoid Biosynthetic Gene Subset. **Cell**, v. 76, p. 543-553, 1994.

GUAN, L.; SCANDALIOS, J. G. Effects of the plant growth regulator abscisic acid and high osmoticum on the developmental expression of the maize catalase genes. **Physiologia Plantarum**, v. 104, n. 3, p. 413-422, 1998a.

GUAN, L.; SCANDALIOS, J. G. Two Structurally Similar Maize Cytosolic Superoxide Dismutase Genes, Sod4 and Sod4A, Respond Differentially to Abscisic Acid and High Osmoticum. **Plant Physiology**, v. 117, n. 1, p. 217-224, 1998b.

GUENIN, S. et al. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 487-493, 2009.

GUTIERREZ, L. et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 6, n. 6, p. 609-618, 2008.

HACHEZ, C. et al. Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers. **Plant Molecular Biology**, v. 62, n. 1-2, p. 305-23, 2006.

HAO, F. et al. Involvement of NADPH oxidase NtrbohD in the rapid production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced by ABA in cultured tobacco cell line BY-2. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 3, p. 267-271, 2008.

HERMES, et al. Apocynin induced nitric oxide is involved in the regulation of transcript levels of genes related to oxidative stress, flavonoid and glutathione synthesis in *Zea mays* leaves. **Biologia Plantarum**. No prelo, 2013.

HIBBERD, J. M.; COVSHOFF, S. The regulation of gene expression required for C<sub>4</sub> photosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 181-207, 2010.

HSU, Y. T.; KAO, C. H. Toxicity in leaves of rice exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. **Plant and Soil**, v. 298, n. 1-2, p. 231-241, 2007.

HU, X. et al. Abscisic acid is a key inducer of hydrogen peroxide production in leaves of maize plants exposed to water stress. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, n. 11, p. 1484-95, 2006.

HU, X. et al. Abscisic acid-induced apoplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. **Planta**, v. 223, n. 1, p. 57-68, 2005.

HU, X. et al. Calcium-calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and functions both upstream and downstream of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in leaves of maize (*Zea mays*) plants. **New Phytology**, v. 173, n. 1, p. 27-38, 2007.

HU, X. et al. Heat shock protein 70 regulates the abscisic acid-induced antioxidant response of maize to combined drought and heat stress. **Plant Growth Regulation**, v. 60, n. 3, p. 225-235, 2009.

HWANG, J.-U.; LEE, Y. Abscisic Acid-Induced Actin Reorganization in Guard Cells of Dayflower Is Mediated by Cytosolic Calcium Levels and by Protein Kinase and Protein Phosphatase Activities. **Plant Physiology**, v. 125, n. 4, p. 2120-2128, 2001.

JIANG, F.; HARTUNG, W. Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 1, p. 37-43, 2008.

JIANG, M.; ZHANG, J. Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. **Planta**, v. 215, n. 6, p. 1022-30, 2002.

JIANG, M; ZHANG, J. Effect of Abscisic Acid on Active Oxygen Species, Antioxidative Defence System and Oxidative Damage in Leaves of Maize Seedlings. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n. 11, p. 1265–1273, 2001.

JONAK, C.; LIGTERINK, W.; HIRT, H. MAP kinases in plant signal transduction. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, n. 2, p. 204-213, 1999.

KARUPPANAPANDIAN, T. et al. Reactive Oxygen Species in Plants: Their Generation, Signal Transduction, and Scavenging Mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 709-725, 2011.

KELLŐS, T. et al. Stress hormones and abiotic stresses have different effects on antioxidants in maize lines with different sensitivity. **Plant Biology**, v. 10, n. 5, p. 563-572, 2008.

KENNEDY, R. A. Photorespiration in C3 and C4 plant tissue cultures: significance of kranz anatomy to low photorespiration in C4 plants. **Plant Physiology**, v. 58, n. 4, p. 573-5, Oct 1976.

KOCSY, G. et al. Abiotic stress-induced changes in glutathione and thioredoxin h levels in maize. **Environmental and Experimental Botany**, v. 52, n. 2, p. 101-112, 2004.

LAWRENCE, C. J. et al. MaizeGDB: The Maize Model Organism Database for Basic, Translational, and Applied Research. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2008, 2008.

LEE, P. D. et al. Control Genes and Variability: Absence of Ubiquitous Reference Transcripts in Diverse Mammalian Expression Studies. **Genome Research**, v. 12, n. 2, p. 292-297, 2002.

LEE, S.; LUAN, S. ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. **Plant Cell and Environment**, v. 35, n. 1, p. 53-60, 2012.

LIU, Y. J. et al. Gene families of maize glutathione-ascorbate redox cycle respond differently to abiotic stresses. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 2, p. 183-92, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

- MARINO, D. et al. A burst of plant NADPH oxidases. **Trends Plant Science**, v. 17, n. 1, p. 9-15, 2012.
- MARRS, K. A. The Functions and Regulation Of Glutathione S-Transferases In Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 127–158, 1996.
- MELLO, C. S. et al. Sodium nitroprusside modulates gene expression involved in glutathione synthesis in *Zea mays* leaves. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 2, p. 383-388, 2012.
- McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocytin). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.
- MEHDY, M. C. Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. **Plant Physiology**, v. 105, p. 467-472, 1994.
- MEISTER, A. Glutathione Metabolism and Its Selective Modification. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 33, p. 17205-17208, 1988.
- MELLO, C. et al. Sodium nitroprusside modulates gene expression involved in glutathione synthesis in *Zea mays* leaves. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 2, p. 383-388, 2012.
- MHAMDI, A. et al. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4197-4220, 2010.
- MHAMDI, A.; NOCTOR, G.; BAKER, A. Plant catalases: Peroxisomal redox guardians. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, n. 2, p. 181-194, 2012.
- MULLINEAUX, P. M.; KARPINSKI, S.; BAKER, N. R. Spatial dependence for hydrogen peroxide-directed signaling in light-stressed plants. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 346-50, 2006.
- NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 165-185, 2005.

NEILL, S.; DESIKAN, J.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 388–395, 2002.

NELSON, T.; LANGDALE, J.A. DEVELOPMENTAL GENETICS OF C4 PHOTOSYNTHESIS. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 25-47, 1992.

NGO T.T., LENHOFF H.M. A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions. **Analytical Biochemistry**, v. 105, p. 389-397, 1980.

NICHOLLS, P. Classical catalase: Ancient and modern. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, n. 2, p. 95-101, 2012.

NOCTOR, G. et al. Glutathione. **Arabidopsis Book**, v. 9, p. e0142, 2011.

NOCTOR, G. et al. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 321, p. 623-647, 1998.

NOCTOR, G. et al. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1283-304, 2002.

NOCTOR, G; FOYER, C. H. ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249–279, 1998.

NOCTOR, G; VANACKER H. L. G; FOYER, C. H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1283–1304, 2001.

OKUDA T, et al. Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment. **Plant Physiology**, v. 97, p. 1265-1267, 1991.

OROZCO-CARDENAS, M; RYAN, C. A. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the

octadecanoid pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 6553–6557, 1999.

PARENT, B. et al. Drought and Abscisic Acid Effects on Aquaporin Content Translate into Changes in Hydraulic Conductivity and Leaf Growth Rate: A Trans-Scale Approach. **Plant Physiology**, v. 149, n. 4, p. 2000-2012, 2009.

PELLINEN, R. I. et al. Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in birch. **Plant Physiology**, v. 130, n. 2, p. 549-60, 2002.

PETERSON, T. Intragenic transposition of Ac generates a new allele of the maize P gene. **Genetics**, v. 126, n. 2, p. 469-476, 1990.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

PFAFFL, M. W. Relative quantification. In: DORAK, T. (Ed.). **Real-time PCR**. New York: Taylor and Francis Group, v.63, 2006. p.63-82.

PILON, M.; RAVET, K.; TAPKEN, W. The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1807, n. 8, p. 989-998, 2011.

POURCEL, L. et al. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 1, p. 29-36, 2007.

RADONIĆ, A. et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, n. 4, p. 856-862, 2004.

REDINBAUGH, M. G.; SABRE, M.; SCANDALIOS, J. G. Expression of the maize Cat3 catalase gene is under the influence of a circadian rhythm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 17, p. 6853-6857, 1990.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. **Fitopatologia brasileira**, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, n. 1, p. 7-12, 1993.

SCHMITTGEN, T. D. et al. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. **Annals of Biochemistry**, v. 285, n. 2, p. 194-204, 2000.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 46, n. 1-2, p. 69-81, 2000.

SEO, M.; KOSHIBA, T. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 1, p. 41-48, 2002.

SHARMA, P. et al. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1305-1319, 2002.

SIDORENKO, L.; CHANDLER, V. RNA-dependent RNA polymerase is required for enhancer-mediated transcriptional silencing associated with paramutation at the maize *p1* gene. **Genetics**, v. 180, n. 4, p. 1983-93, 2008.

SNYRYCHOVA, I.; AYAYDIN, F.; HIDEG, E. Detecting hydrogen peroxide in leaves in vivo - a comparison of methods. **Physiologia Plantarum**, v. 135, n. 1, p. 1-18, 2009.

SODERLUND, C. et al. Sequencing, Mapping, and Analysis of 27,455 Maize Full-Length cDNAs. **PLoS Genet**, v. 5, n. 11, 2009.

TENA, G. et al. Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, n. 5, p. 392-400, 2001.

THANNICKAL, V. J; FANBURG, B. L, Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, p. L1005-L1028, 2000.

THORDAL-CHRISTENSEN, H. et al. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. **The Plant Journal**, v. 11, n. 6, p. 1187-1194, 1997.

TIPPLE, B. J.; PAGANI, M. The Early Origins of Terrestrial C<sub>4</sub> Photosynthesis. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 35, n. 1, p. 435-461, 2007.

TORRES, M. A. ROS in biotic interactions. **Physiologia Plantarum**, v. 138, n. 4, p. 414-29, 2010.

TOSSI, V.; CASSIA, R.; LAMATTINA, L. Apocynin-induced nitric oxide production confers antioxidant protection in maize leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 12, p. 1336-41, 2009.

VAN BREUSEGEM, F. et al. Ascorbate peroxidase cDNA from maize. **Plant Physiology**, v. 107, n. 2, p. 649-50, 1995.

VAN BREUSEGEM, F.; DAT, J. F. Reactive oxygen species in plant cell death. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 384-90, 2006.

VANACKER, H; CARVER, T. L. W; FOYER, C. H. Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Accumulation in Mesophyll Cells Leads to Induction of Glutathione during the Hyper-Sensitive Response in the Barley-Powdery Mildew Interaction1. **Plant Physiology**, v. 123, p. 1289–1300, 2000.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, 2002.

WILLEKENS, H. et al. Catalases in plants. **Molecular Breeding**, v. 1, n. 3, p. 207-228, 1995.

WILLIAMSON, J. D.; SCANDALIOS, J. G. Differential response of maize catalases to abscisic acid: Vp1 transcriptional activator is not required for abscisic acid-regulated Cat1 expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 18, p. 8842-8846, 1992.

WITZANY, G. et al. Plant Hormones and Metabolites as Universal Vocabulary in Plant Defense Signaling. In: (Ed.). **Biocommunication of Plants**: Springer Berlin Heidelberg, v.14, 2012. p.37-50.

XING, Y.; JIA, W.; ZHANG, J. AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production via AtMPK6-coupled signaling in Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 54, n. 3, p. 440-51, 2008.

XIONG, L.; ZHU, J.-K. Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 133, n. 1, p. 29-36, 2003.

YUAN, J. S. et al. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**, v. 7, p. 85, 2006.

ZHANG, A. et al. ZmMPK5 is required for the NADPH oxidase-mediated self-propagation of apoplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in brassinosteroid-induced antioxidant defence in leaves of maize. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4399-411, Oct 2010.

ZHANG, A. et al. 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, n. 2, p. 475-87, Jun 2006.

ZHANG, F.; PETERSON, T. Gene conversion between direct noncoding repeats promotes genetic and phenotypic diversity at a regulatory locus of *Zea mays* (L.). **Genetics**, v. 174, n. 2, p. 753-62, 2006.