

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

CARLA SOUZA DE MELLO

**EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS
NA SÍNTESE DE GLUTATIONA E DE FLAVONÓIDES**

Florianópolis, SC

2010

CARLA SOUZA DE MELLO

**EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS
NA SÍNTESE DE GLUTATIONA E DE FLAVONÓIDES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Depto Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Ana Carolina Maisonnave Arisi

Florianópolis, SC

2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

M527e Mello, Carla Souza de
Efeito do óxido nítrico sobre a expressão de genes
envolvidos na síntese de glutatona e de flavonóides
[dissertação] / Carla Souza de Mello ; orientadora,
Ana Carolina Maisonnave Arisi. - Florianópolis, SC,
2010.
69 p.: grafs, tabs.

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

Inclui referências

1. Ciência dos alimentos. 2. Óxido Nítrico. 3. Expressão
Gênica. 4. Milho-doce. 5. Pinheiro-do-Paraná. I. Arisi, Ana
Carolina Maisonnave. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos. III. Título.

CDU 663

**EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS
NA SÍNTESE DE GLUTATIONA E DE FLAVONÓIDES**

Por

Carla Souza de Mello

Dissertação aprovada como requisito final para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos pela comissão formada por

Presidente:

Profa. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi (UFSC)

Membro:

Profa. Dra. Claudete Santa-Catarina (UENF)

Membro:

Dr. Paulo Sérgio Schögl (UFSC)

Membro:

Profa. Dra. Marilde Terezinha Bordignon Luiz (UFSC)

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2010

MELLO, C. S. **Efeito do óxido nítrico sobre a expressão de genes envolvidos na síntese de glutathiona e de flavonóides.** 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina [2010].

RESUMO

Compostos bioativos presentes em vegetais e frutas são fatores de regulação da expressão de genes humanos. Dentre os compostos bioativos, os antioxidantes desempenham importante função na promoção da saúde, e grande parte da atividade antioxidante de frutas é proporcionada por flavonóides. Flavonóides são compostos que desempenham importante função nas relações entre vegetais e o ambiente. Estão envolvidos nos mecanismos de defesa da planta contra condições não favoráveis ao seu desenvolvimento, como em estresses abióticos. Entre os diversos antioxidantes encontrados em plantas, glutathiona é fortemente relacionado à tolerância a estresses abióticos. O óxido nítrico (NO) é uma molécula diretamente envolvida no processo de adaptação ambiental de plantas, e tem sido descrita como um importante elemento sinalizador. As atividades biológicas do NO são inúmeras e complexas, estando inclusive envolvido na regulação da rota de síntese de flavonóides. Visando um melhor entendimento do mecanismo molecular de ação de NO em plantas, este trabalho teve como objetivo: utilizar milho (*Zea mays*) como modelo para verificar a influência de doadores ou indutores de NO na expressão de actina e de cinco genes envolvidos na síntese de glutathiona ou de flavonóides e também clonar um cDNA de um fator de transcrição MYB de *Araucaria angustifolia*. Em relação ao primeiro objetivo, folhas de milho foram tratadas por 12 h com doador de NO (nitroprussiato de sódio, SNP) ou indutor de NO (apocinina) e a expressão do gene de actina (*act*) e de genes envolvidos na síntese de flavonóides (*chs*, *pal.1*, *P1*) ou glutathiona (γ -*ecs*, *gsh-s*) foram quantificados por PCR em tempo real. Verificou-se que os níveis de transcritos de γ -*ecs* e *gsh-s* aumentaram 9,5 e 12,4 vezes sob tratamento com SNP, respectivamente, enquanto, após tratamento com apocinina, os transcritos γ -*ecs* e *gsh-s* apresentaram valores de 0,7 e 3,5 vezes. Folhas tratadas com SNP não apresentaram mudanças significativas de expressão em *pal.1*. Transcritos de *chs* e *P1* apresentaram pequeno aumento na expressão (1,5 e 3 vezes, respectivamente) quando as folhas foram tratadas com SNP. Nossos resultados mostraram que a síntese de glutathiona pode ser modulada por NO exógeno em folhas de milho. Em relação ao segundo objetivo, o RNA total de linhagens celulares, embriões zigóticos e plântulas de *A. angustifolia* foi extraído e sintetizado um cDNA para inserção em vetores de clonagem e seqüenciamento. Utilizaram-se iniciadores degenerados desenhados a partir de regiões altamente conservadas de fatores de transcrição MYB de diferentes espécies de embriófitas. Para os fragmentos amplificados a parti dos cultivos de plantas que foram clonados e seqüenciados, verificou-se alta homologia com RNA ribossomal de várias espécies de coníferas, grupo em que se encontra o gênero *Araucaria*.

Palavras-chave: óxido nítrico, expressão gênica, fator de transcrição MYB, *Zea mays*, *Araucaria angustifolia*.

MELLO, C. S. **Nitric oxide effect on gene expression involved in glutathione and flavonoid synthesis.** 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina [2010].

ABSTRACT

Bioactive compounds present in vegetables and fruits are involved in gene regulation. Among the bioactive compounds, antioxidants play important role promoting health, and most antioxidant activities from fruits are provided by flavonoids. Flavonoids have significant magnitude implicated in relations between plants and environment. They are involved in plant defense mechanism against non favorable conditions to its development such as abiotic stresses. Among diverse antioxidant compounds found in plants, glutathione is strongly related to tolerance to abiotic stress. Nitric oxide (NO) is a diffusible molecule directly involved in environmental adaptation in plants, and it has been described as a critical signaling element. Biological activities of NO are innumerable and complex, and it is involved in flavonoid biosynthesis pathway regulation. In order to clarify molecular mechanism of NO action in plants, the aim of the present work was: to use maize (*Zea mays*) as model to verify the influence of NO donors or inducers in expression of actin gene and five genes involved in glutathione or flavonoid synthesis and also to clone a cDNA of a transcription factor R2R3-MYB in *Araucaria angustifolia*. For the first objective, maize leaves were treated for 12 h with a NO donor (sodium nitroprusside, SNP) or NO inducer (apocynin); and expression of genes of actin (*act*), involved in flavonoid synthesis (*chs*, *pal.1*, *P1*) or glutathione synthesis (γ -*ecs*, *gsh-s*) were quantified by real-time PCR. The level of γ -*ecs* and *gsh-s* transcripts were increased 9.5-fold and 12.4-fold following SNP treatment, respectively, while after apocynin treatment γ -*ecs* and *gsh-s* transcripts were 0.7-fold and 3.5-fold. SNP-treated maize leaves did not show significant changes in *pal.1*. Expression of *chs* and *P1* presented little increase (1.5-fold and 3-fold, respectively) when leaves were treated with SNP. Our results have shown that glutathione synthesis could be modulated by exogenous nitric oxide in maize leaves. For the second objective, total RNA from cell lineages, zygotic embryos and seedlings of *A. angustifolia* was extracted and cDNA synthesized to insertion in cloning vectors and sequencing. Degenerated primers designed from highly conserved regions of MYB transcription factors from different embryophytes were used. The amplified fragments that were cloned and sequenced presented high homology with ribosomal RNA from different conifers, a division that includes *Araucaria* gender.

Key words: nitric oxide, gene expression, MYB transcription factor, *Zea mays*, *Araucaria angustifolia*.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela iluminação em meu caminho e pelas oportunidades oferecidas.

À minha mãe Lídice e meu segundo pai, Arnizaut, minhas fontes de energia, por todo o carinho e incentivo na minha caminhada profissional e pessoal.

Ao meu falecido pai Carlos, que sempre está presente de alguma forma.

À professora Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi pela orientação, constante apoio e incansável ensinamento.

Aos integrantes do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (UFSC) pelo auxílio técnico, empréstimo de material e de espaço físico.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFPR), especialmente ao Prof. Emanuel Maltempi de Souza, pelo seqüenciamento das amostras.

Ao Prof. Dr. Raúl Cassia, da Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina, por todas as informações técnicas compartilhadas.

Ao Prof. Dr. Paulo Emilio Lovato, do Depto. de Engenharia Rural (UFSC), pela colaboração no projeto.

Aos professores e funcionários do Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC, sempre muito prestativos e atenciosos.

Aos companheiros do Lab. de Biologia Molecular que, mais do que colegas, tornaram-se amigos, pelo apoio para o desenvolvimento deste trabalho e pelo companheirismo permanente.

Aos queridos integrantes de laboratórios “vizinhos” por todos os agradáveis e descontraídos momentos compartilhados.

A todas as pessoas muito especiais que estiveram presentes e que trouxeram sua essencial contribuição para a conclusão de mais essa etapa, pelos conselhos, incentivo, paciência, carinho e dedicação.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, pela oportunidade de realizar o curso.

À FINEP, edital GENOPROT 2007, pelo financiamento do projeto e ao CNPq por parte da bolsa concedida e à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

"A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade."

Julio Verne

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.1** Fórmula estrutural de nitroprussiato de sódio (SNP)..... 19
- Figura 1.2** Fórmula estrutural de ferricianeto de potássio (FeCN)..... 19
- Figura 1.3** Fórmula estrutural de 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona (apocinina).....20
- Figura 1.4** Fórmula estrutural de N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)20
- Figura 1.5** Rota biossintética de formação de antocianina em casca de maçã27
- Figura 1.6** Esquema da síntese de glutatona29

Capítulo 2

- Figura 2.1** Curva de calibração para α -tubulina com concentrações de cDNA diluídas de forma seriada a partir de 10² ng38
- Figura 2.2** Análise de expressão de A) γ -glutamilcisteína sintetase *γ -ecs*, B) glutatona sintetase *gsh-s*, C) chalcona sintase *chs*, D) fenilalanina amônia liase *pal.1*, E) Proteína P relacionada a myb *P1* e F) actina 1 *act* em folhas de milho tratadas40

Capítulo 3

- Figura 3.1** Alinhamento para o desenho de iniciadores degenerados.....52
- Figura 3.2** Seqüência obtida com fragmentos amplificados com iniciadores M4F/M4R a partir de espículas de plântulas crescidas em meio S₀.....54
- Figura 3.3** Seqüência obtida com fragmentos amplificados com iniciadores M4F/M4R a partir de espículas de plântulas tratadas com putrescina55

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.1 Genes relacionados ao estresse oxidativo modulados por NO.....	22
--	----

Capítulo 2

Tabela 2.1 Iniciadores utilizados para RT-PCR em tempo real	37
--	----

Capítulo 3

Tabela 3.1 Iniciadores desenhados para amplificação de regiões no gene de <i>A. angustifolia</i> correspondentes aos fatores de transcrição MYB de <i>A. thaliana</i> e <i>V. vinifera</i>	48
---	----

Tabela 3.2 Similaridade (Blast N) da seqüência de espículas de plântulas crescidas em meio S ₀ amplificadas com iniciadores M4F/M4R	57
---	----

Tabela 3.3 Similaridade (Blast N) da seqüência de espículas de plântulas tratadas com putrescina amplificadas com iniciadores M4F/M4R.....	58
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA** – aminoácido
- ABA** – ácido abscísico
- APO** – apocinina
- cDNA** – DNA complementar
- CHS** – chalcona sintase
- Cys** – cisteína
- DNA** – ácido desoxirribonucléico
- DP** – desvio padrão
- Glu** – glutamina
- GSH** – glutationa
- GSH-S** – glutationa sintetase
- GSNO** – S- nitrosoglutationa
- L-NAME** – N^G-nitro-L-arginina metil éster;
- NADPH** – Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
- NO** – óxido nítrico;
- NOC-18** – (3,3bis(Aminoetil)-1-hidroxi-2-oxo-1-triazeno
- nt** – nucleotídeos
- PAL** – fenilalanina amônia liase
- PCR** – *Polymerase Chain Reaction*, Reação em Cadeia da Polimerase
- PUT** – putrescina
- RNA** – ácido ribonucléico
- ROS** – espécies reativas de oxigênio
- SNAP** – S-Nitroso-N-acetilpenicilamina
- SNP** – nitroprussiato de sódio
- γ-EC** – γ -glutamilcisteína
- γ-ECS** – γ -glutamilcisteína sintetase

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1	15
1.1 Antioxidantes vegetais na alimentação humana	15
1.2 Óxido nítrico	16
1.3 Doadores exógenos de NO e indutores de NO	18
1.4 Genes induzidos e reprimidos por NO	21
1.5 Fatores de transcrição MYB	23
1.6 Flavonóides	26
1.7 Glutathiona	28
1.8 Milho.....	29
1.9 Araucária	31
 CAPÍTULO 2	
ÓXIDO NÍTRICO EXÓGENO MODULA A SÍNTESE DE GLUTATIONA EM FOLHAS DE <i>Zea mays</i>	33
 CAPÍTULO 3	
CLONAGEM DE FRAGMENTO DE RNA RIBOSSÔMICO DE UM FATOR DE TRANSCRIÇÃO R2R3-MYB DE <i>Araucaria angustifolia</i>	44
 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
 REFERÊNCIAS.....	60

INTRODUÇÃO

Compostos bioativos presentes em vegetais e frutas são fatores de regulação da expressão de genes humanos. Dentre os compostos bioativos, os antioxidantes desempenham importante função na promoção da saúde, e grande parte da atividade antioxidante de frutas é proporcionada por flavonóides. Flavonóides são compostos que desempenham importante função nas relações entre vegetais e o ambiente. Estão envolvidos nos mecanismos de defesa da planta contra condições não favoráveis ao seu desenvolvimento, como em estresses abióticos. Entre os diversos antioxidantes encontrados em plantas, glutathione é fortemente relacionado à tolerância a estresses abióticos.

As plantas são organismos multicelulares capazes de adaptar-se a diferentes condições ambientais para que seus elementos estruturais como raízes, folhas e flores sejam mantidos intactos ou com o menor dano possível mesmo em eventuais circunstâncias desfavoráveis que possam prejudicar seu desenvolvimento. O óxido nítrico (NO) é uma molécula diretamente envolvida nesse processo de adaptação ambiental, e tem sido descrita como um importante elemento sinalizador tanto em animais como em plantas. As atividades biológicas do NO são inúmeras e complexas.

A ação do NO pode ser direta, pela reação com moléculas efetoras, ou indireta, modificando o estado redox da célula (LAMATTINA et al., 2003; CRAWFORD, 2006). A nitrosilação de proteínas em cisteínas específicas surgiu como um mecanismo primário de ação de NO (HESS et al., 2005). SERPA e colaboradores (2007) demonstraram que o NO modifica a ligação ao DNA do fator de transcrição MYB2 de *Arabidopsis thaliana*. Este foi o primeiro trabalho que demonstrou a regulação de um fator de transcrição de plantas por S-nitrosilação.

Fatores de transcrição da família MYB têm sido descritos como reguladores da expressão de diversos genes, sendo largamente encontrados em diferentes espécies vegetais (STRACKE; WERBER; WEISSHAAR, 2001). Eles estão envolvidos na rota metabólica de síntese de flavonóides (LEPINIEC et al., 2006), e têm envolvimento direto no sistema de defesa de plantas ao ataque de patógenos ou outras condições de estresse (WINKEL-SHIRLEY, 2002).

O ramo da via de fenilpropanóides que produz pigmentos flavonóides em plantas é um excelente modelo para estudo de regulação transcricional. Os genes de síntese de flavonóides são regulados durante desenvolvimento e em resposta a vários estresses bióticos e abióticos por uma combinação de fatores de transcrição. Estes reguladores transcricionais incluem membros das famílias MYB e bHLH (GONZÁLES et al., 2008).

Os flavonóides, derivados de fenilpropanóides, são metabólitos secundários aromáticos que desempenham diversas e importantes funções biológicas, entre elas, absorção de UV, resposta ao ataque de patógenos, baixas temperaturas e deficiência de nutrientes (LEA et al., 2007). A biossíntese de flavonóides é iniciada por uma etapa enzimática catalisada pela chalcona sintase (CHS) e fenilalanina amônia liase (PAL), que é a primeira enzima da rota biossintética dos fenilpropanóides. NO causou rápida indução de transcritos de *chs* e *pal* em extratos celulares de soja (DELLEDONE et al., 1998). Além disso, NO exógeno aumentou a atividade de PAL em folhas de tabaco (DURNER; WENDEHENNE; KLESSIG, 1998) e em calos de *Ginkgo biloba* (HAO; SUN; CAI, 2009)

O tripeptídeo glutationa (GSH) é o composto tiólico de baixo peso molecular mais abundante nas células vegetais. GSH é um importante tampão redox, sintetizado por γ -glutamilcisteína sintetase (γ -ECS) e glutationa sintetase (GSH-S).

Araucaria angustifolia é a única espécie de pinheiro nativa típica da Região Sul do Brasil. Devido à sua extensa exploração nas últimas décadas, encontra-se ameaçada de extinção (GUERRA, 2002). Pesquisas têm sido realizadas visando o melhoramento e desenvolvimento da espécie, porém estudos a nível molecular ainda são escassos, e eles tornariam possível melhor entendimento da expressão de genes que regulam funções vitais para as plantas, como seu mecanismo de resposta hipersensitiva (DANIEL et al., 1999). A embriogênese somática de araucária é estudada como uma alternativa para sua propagação (SILVEIRA et al., 2002; 2006). O conhecimento de eventos bioquímicos e morfológicos que ocorrem durante o desenvolvimento inicial do embrião somático é fundamental para aumentar a eficiência dos protocolos de embriogênese de araucária. SILVEIRA e colaboradores (2006) observaram que o tratamento de células embrionárias de araucária com putrescina (PUT) levou ao aumento da liberação de NO e propuseram que a síntese de NO está relacionada à manutenção da polaridade do embrião somático de araucária.

Visando um melhor entendimento do mecanismo molecular de ação de NO em plantas, este trabalho teve como objetivos: utilizar milho (*Zea mays*) como modelo para verificar a influência de doadores ou indutores de NO na expressão de actina e de cinco genes envolvidos na síntese de glutathiona ou de flavonóides, e também clonar um cDNA responsável pela codificação de um fator de transcrição R2R3-MYB de *Araucaria angustifolia*. Este trabalho conta com o financiamento FINEP GENOPROT 2007, projeto “S-Nitrosilação de fatores de transcrição e morte celular programada” coordenado pela Prof^a Ana Carolina Maisonnave Arisi.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Antioxidantes vegetais na alimentação humana

Considerando a importância emergente da nutrição no desenvolvimento de doenças crônicas, é necessário desenvolver alimentos não apenas seguros, mas também que contribuam para a manutenção da saúde e que possam prevenir o desenvolvimento de doenças específicas. O papel da dieta está bem estabelecido no risco de incidência de doenças como câncer, arteriosclerose, diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares (EVANS et al., 2006). A consistência de dados epidemiológicos e experimentais indicando os efeitos benéficos levou organizações governamentais de diversos países a aconselhar o aumento no consumo de vegetais e frutas.

Compostos bioativos presentes nos vegetais e frutas são fatores efetivos de regulação da expressão de genes humanos, tais como, vitaminas (tocoferol, folato, biotina), minerais (zinco) e fitoquímicos (flavonas, catequinas). Entre estes compostos bioativos, os antioxidantes causam efeitos benéficos sobre a promoção de saúde pela redução da inflamação que acompanha muitas doenças crônicas. Inicialmente, as investigações em antioxidantes estavam focadas em vitaminas e carotenóides, entretanto, esclareceu-se que grande parte da atividade antioxidante de frutas é proporcionada por flavonóides (D'AMICO; PERROTA, 2005). Por um lado, a nutrigenômica tem esclarecido o papel dos compostos fenólicos em doenças crônicas (RIST et al., 2006); de outro, a fisiologia e a biologia molecular vegetal tem estabelecido as rotas metabólicas e a regulação da expressão gênica destes compostos em vegetais (LEPINIEC et al., 2006).

Os antioxidantes de baixo peso molecular, como ascorbato, glutathiona e tocoferóis, são tampões redox, que interagem com numerosos componentes celulares (ARISI et al., 1997; NOCTOR et al., 1998). Os flavonóides são metabólitos secundários aromáticos que desempenham diversas e importantes funções biológicas (LEA et al., 2007). Mais de 6000 diferentes flavonóides já foram relatados

e subdivididos em diferentes classes incluindo flavonóis, flavanóis, flavonas e antocianinas, de acordo com o grau de oxidação do anel aromático (SCHIJLEN et al., 2004).

1.2 Óxido nítrico

O NO é uma espécie reativa de nitrogênio, um gás altamente reativo, lipossolúvel, instável e difusível, e apresenta grande versatilidade, está envolvido em numerosos processos fisiológicos em espécies distantes filogeneticamente (GOW; ISCHIROPOULOS, 2001). Foi inicialmente descrito como um composto tóxico, porém já é reconhecido como uma importante molécula sinalizadora e efetora envolvida tanto na fisiologia celular de plantas como de animais. Em mamíferos desempenha funções como vasodilatação, neurotransmissão e resposta imune. Em comparação com estudos em animais, o conhecimento sobre as funções biológicas do NO em plantas estão começando a ser elucidadas (NEIL et al, 2007).

A produção de NO em mamíferos pode ser explicada por dois mecanismos diferentes: através da ação de uma nitrato redutase (NR), que, após fazer a redução do nitrato a nitrito, pode reduzir o nitrito a NO, na presença de NADPH (ROCKEL et al., 2002) ou pela via da óxido nítrico sintase (NOS), em que há a conversão de L-arginina na presença de oxigênio em citrulina e NO (DELLEDONNE et al., 1998; DURNER; WENDEHENNE; KLESSIG, 1998; WEICHSEL et al., 2005). A natureza quimérica do NO permite que se esta molécula se apresente sob três formas diferentes: radical NO^\bullet ou sob uma das formas ionizadas NO^+ ou NO^- . A formação de NO em plantas, no entanto, ainda não foi completamente elucidada, tendo sido sugerido um mecanismo similar através da NR, enzima que possibilitou uma primeira abordagem conhecida para sintetizar NO em vegetais. Foi identificada uma proteína com pouca similaridade à NOS de animais, porém que possui propriedades bioquímicas semelhantes (CRAWFORD, 2006).

Uma importante reação biológica mediada por NO é a S-nitrosilação, um mecanismo de regulação pós-traducional das proteínas que envolve a conversão de grupamentos tiólicos, como resíduos de cisteína, para formação de S-nitrosotióis

(HESS et al., 2005). A S-nitrosilação de proteínas é um importante mecanismo na regulação de fatores de transcrição, podendo explicar a influência do NO na expressão de genes com diferentes funções fisiológicas (GRÜN et al., 2006).

SERPA e colaboradores (2007) demonstraram que o NO modifica a atividade de ligação ao DNA do fator de transcrição MYB2 de *A. thaliana*. Mais precisamente, a S-nitrosilação de Cys53 inibiu a ligação ao DNA de AtMYB2, estabelecendo assim uma relação entre o estado redox e a ligação ao DNA de um fator de transcrição MYB de plantas, demonstrando a regulação de um fator de transcrição de plantas por S-nitrosilação.

O interesse no NO como potente regulador endógeno do crescimento, desenvolvimento e resistência a patógenos em plantas cresceu exponencialmente nos últimos anos (NEIL et al., 2007). Estudos sobre NO têm sugerido que esta molécula estaria envolvida no mecanismo de respostas adaptativas a condições adversas. Foi mostrado que o NO tem potente capacidade antioxidante em plantas, dando proteção contra danos causados por herbicidas (BELIGNI; LAMATTINA, 1999). Também estaria envolvido na rota de sinalização de ácido abscísico (ABA), hormônio envolvido na resposta a condições extremas em plantas (GARCIA-MATA; LAMATTINA, 2002).

Mecanismos complexos de defesa das plantas ao ataque de patógenos já foram estudados. Eles são influenciados por diversos fatores que envolvem a resposta hipersensitiva, que é a rápida morte das células em contato direto ou próximas ao patógeno. A resposta hipersensitiva induz o confinamento do organismo invasor impedindo que ele se alastre a partir do sítio de infecção, consistindo em uma forma de morte celular programada (VAILLEAU et al., 2002). Durante o estresse oxidativo que precede a resposta hipersensitiva observa-se um acúmulo correlacionado de NO e espécies reativas de oxigênio (ROS) como H₂O₂ ou O²⁻ (DELLEDONE et al., 1998; GRÜN et al., 2006). Apesar de NO sozinho não ser suficiente para indução da morte celular, ele influencia na expressão de genes envolvidos nesse processo, como *Pr-1* e *pal*, em folhas de tabaco (DURNER; WENDEHENNE; KLESSIG, 1998) e *pal* e *chs* em soja (DELLEDONE et al., 1998). O tratamento de folhas de *A. thaliana* com NO mostrou influência na atividade transcricional de um amplo grupo de genes (POLVERARI et al., 2003).

Devido ao grande número de possíveis mecanismos de ação do NO, uma clara representação de seu envolvimento em diversos processos fisiológicos ainda

está longe de ser atingido. A influência do NO também no teor de etileno presente em diversas plantas tem sido estudada. O etileno tem importante papel na maturação e senescência de tecidos de plantas, estando envolvido na germinação, na resposta ao estresse e no amadurecimento dos frutos (LAMATTINA, 2003). A aplicação exógena de NO aumentou a disponibilidade pós-colheita de cultivares frescos pela inibição da produção de etileno (LESHEM; WILLS; KU, 1998), demonstrando o efeito antagônico desses gases. Também foi verificado um maior teor de NO e baixa concentração de etileno em frutos verdes, e ao longo do amadurecimento observou-se decréscimo de NO e aumento de etileno (LESHEM; PINCHASOV, 2002).

Muitas informações a respeito das funções exercidas por NO nas plantas provêm de pesquisas com enfoque farmacológico usando doadores, seqüestradores ou inibidores de NO, que pode tornar difícil a distinção entre o efeito fisiológico ou influenciado pelo tratamento químico nas respostas metabólicas dos indivíduos (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007). Por isso a aplicação de NO sob diversas formas possíveis deve ser avaliada a fim de se permitir a reprodutibilidade das respostas metabólicas induzidas pelos doadores (FLORYSZAK-WIECZOREK et al., 2006).

1.3 Doadores exógenos de NO e indutores de NO

Devido à alta instabilidade desta molécula, existe uma crescente busca por compostos que sejam capazes de gerar NO *in situ*, como doadores de NO. Todos os compostos que possuem a ligação nitrogênio-oxigênio são capazes de se decompor, serem oxidados ou reduzidos produzindo espécies reativas de nitrogênio. Por causa da grande diversidade estrutural destes compostos, muitos são os mecanismos possíveis de geração de NO (WANG et al., 2002).

Embora a disponibilidade de NO endógeno seja verificada em diversos sistemas, uma maior concentração pode ser gerada pela ação de doadores exógenos. Altos níveis de NO são atingidos pela aplicação de nitrito sob condições

anaeróbias (ROCKEL et al., 2002) ou pela desregulação de NR através de mutações no sítio de fosforilação da enzima (LEA et al., 2007).

Alguns compostos são reconhecidamente efetivos doadores de NO. Este composto é um eficaz ligante a íons metálicos, sendo que seus principais alvos de ligação sob condições biológicas regulatórias são os centros metálicos. Inversamente, compostos metálicos nitrosilados podem atuar como doadores de NO (WANG, 2002). Nitroprussiato de sódio (SNP, Figura 1.1) é identificado como um eficaz doador de NO (FLORYSZAK-WIECZOREK et al., 2006), capaz de liberar essa molécula quando induzido por luz (WANG et al., 2002).

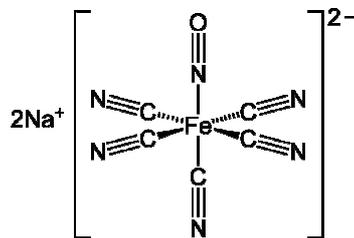


Figura 1.1: Fórmula estrutural de nitroprussiato de sódio (SNP). Fonte: Sigma-Aldrich.

SNP, doador do íon NO^+ , apresentou efeito diferente de SNAP, GSNO ou NOC-18, que são doadores do radical NO^\bullet . Culturas celulares de *Arabidopsis* tratadas com SNP tiveram aumento no acúmulo de transcritos de ferritina, uma importante proteína para a homeostase de ferro, enquanto os outros doadores inibiram esses genes (MURGIA et al., 2004a). Um dos produtos de degradação de SNP é o ferricianeto de potássio (FeCN), que difere desta molécula pela presença de uma ligação CN (Figura 1.2)

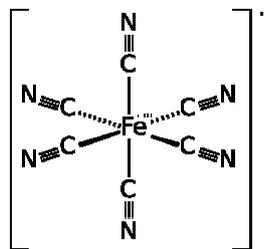


Figura 1.2: Fórmula estrutural de ferricianeto de potássio (FeCN). Fonte: Sigma-Aldrich.

Outro importante indutor de NO é apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona; acetovanilona; Figura 1.3), um catecol metoxi-substituído que estabiliza o NO em células endotélicas (STEFFEN, 2007; RIGANTI et al., 2008).

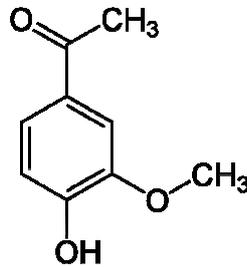


Figura 1.3: Fórmula estrutural de 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona (apocinina).

Fonte: Sigma-Aldrich.

É um composto que foi inicialmente isolado de *Picrorrhiza kurroa*, uma planta encontrada no Himalaia, e desde então tem sido usada para fins medicinais por suas propriedades antiinflamatórias por evitar a formação de radicais livres (MEYER; SCHMITT, 2000). Embora informações sobre esse composto ainda sejam escassas, já foi reportado que a APO induz a síntese de NO pela geração de ROS, inibindo a ação da enzima NADPH oxidase (RIGANTI et al., 2008). Em pesquisa recente foi evidenciado que apocinina é capaz de estimular o acúmulo de NO em plântulas de milho de modo similar à NOS e também de aumentar a tolerância da planta a diversos estresses oxidativos abióticos (TOSSI; CASSIA; LAMATTINA, 2009).

O composto N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, Figura 1.4) é um inibidor de NOS, enzima responsável pela formação de NO em tecidos animais (FÖRSTERMANN et al., 1991), e evidências demonstraram estar envolvido também na formação do composto em tecidos vegetais porém através de mecanismos mais complexos (CRAWFORD, 2006). Em combinação com apocinina, L-NAME é capaz de reduzir a produção de NO em até 70% (TOSSI; CASSIA; LAMATTINA, 2009).

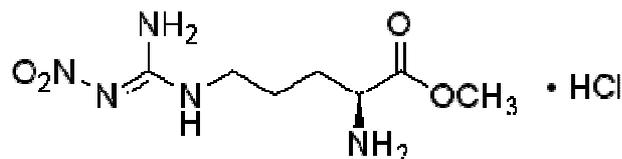


Figura 1.4: Fórmula estrutural de N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME).

Fonte: Sigma-Aldrich.

1.4 Genes induzidos e reprimidos por NO

O NO tem sido cada vez mais freqüentemente alvo de pesquisas que demonstram que esta molécula tem importante participação em um grande número de rotas metabólicas de sinalização molecular em plantas (GRÜN et al., 2006; FLORYSZAK-WIECZOREK et al., 2006; ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007; LEITNER et al., 2009). Nessas pesquisas, diversos genes se mostram induzidos ou reprimidos pela ação do NO, principalmente em resposta a estresses ambientais (Tabela 1.1). Estudos têm demonstrado que NO influencia no crescimento e desenvolvimento de plantas, transdução de sinal e resistência a doenças. SCHÄEFER (1997) comprovou que NO estimula a indução de genes como *chs* e *pal.1*, codantes das enzimas CHS e fenil alanina amônia liase (PAL), respectivamente. A indução destes genes está relacionada à defesa da planta ao ataque de patógenos, limitando o crescimento da infecção bacteriana. Também foi verificada a participação do NO na resposta de plantas à radiação UV-B, demonstrando indução da expressão de *chs* em situação pós-estresse (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007).

Tabela 1.1: Genes relacionados ao estresse oxidativo modulados por NO.

Planta modelo	Indutor ou tratamento	Expressão gênica	Citação
<i>A. thaliana</i> Col-0 Análise: AFLP	SNP infiltrado em folhas	Total de 2500 cDNAs analisados, dos quais: 69 expressos (relacionados a transdução de sinal, resistência e morte celular, ROS, cloroplasto, transporte, metabolismo basal e proteínas desconhecidas) 2 reprimidos (uma lipolil transferase e uma quinase)	POLVERARI et al., 2003
<i>A. thaliana</i> Col-0 Análise: Microarranjo	SNP aplicado nas raízes	Total de 24 000 genes analisados, dos quais: 342 expressos (relacionados a mecanismos de defesa, proteção contra estresse oxidativo, transdução de sinal e fatores de transcrição) 80 reprimidos	PARANI, 2004
Plantas e suspensão celular de <i>N. tabacum</i> cv. <i>Xanthi</i>	NOS, GSNO, SNAP de mamíferos	Expressão de PAL	DURNER; WENDEHENNE; KLESSIG, 1998
Suspensão celular de <i>Glycine max</i>	SNP	Expressão de Pr-1, PAL, CHS	DELLEDONNE et al., 1998
Plantas e suspensão celular de <i>A. thaliana</i> Col-0	NO gasoso e NOR-3	Expressão de AOX1a, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, glutaredoxinas	HUANG et al., 2002
Plantas de <i>A. thaliana</i> Col-0	NO gasoso	Expressão de AOS, LOX2, OPR3 (PDF1.2 e JIP na ausência de ácido salicílico)	HUANG et al., 2004
Plantas de <i>A. thaliana</i> Col-0: selvagens e mutantes superexpressando tAPX	SNP	Repressão de tAPX	MURGIA et al., 2004b

Fonte: adaptado de GRÜN et al., 2006. Notas: AFLP, polimorfismo do comprimento do fragmento amplificado; NOR-3, (E)-etil-2-[(E)-hidroxi-imino]-5-nitro-3-hexeno amida; AOX, oxidase alternativa; AOS, aleno óxido sintase; LOX, lipooxigenase; OPR3, 12-oxofitodienoato redutase; PDF1.2, defensina de planta; JIP, proteína induzida por ácido jasmônico; tAPX, ascorbato peroxidase tilacoidal.

As enzimas CHS e PAL1 são precursoras na rota de biossíntese de flavonóides (BOREVITZ et al., 2000). Já foi demonstrado que a síntese das duas enzimas é modulada pela presença de NO em plantas (DURNER; WENDEHENNE; KLESSIG, 1998; DELLEDONNE et al., 1998).

Pericarp color1 (P1) é uma proteína da família MYB envolvida na regulação de metabólitos secundários de algumas plantas (HEINE et al., 2007). Um pequeno grupo de genes dessa família encontrado em algumas gramíneas foi caracterizado por conter uma substituição de prolina por alanina (chamado R2R3-MYB^{P-to-A}) na região central entre as repetições R2 e R3 (RABINOWICZ et al., 1999). A mudança prolina-alanina (P-to-A) encontrada nesta família não foi encontrada em genes *myb* de *Arabidopsis* estudados até o momento. Além disso, essa família contém o gene P, que ativa um subgrupo de genes de biossíntese de flavonóides em milho e controla o acúmulo de 3-deoxi flavonóides, como os pigmentos avermelhados flobafeno (GROTEWOLD et al., 1994). Já foi demonstrado que P está envolvido na biossíntese de algumas flavonas relacionadas à atividade inseticida em tecidos de milho (GROTEWOLD et al., 1998). Dentre os genes R2R3-MYB^{P-to-A}, P1 demonstra ter uma importante função na biossíntese de flavonóides em milho (GROTEWOLD et al., 1994).

1.5 Fatores de transcrição MYB

A expressão dos genes é regulada por processos que afetam as velocidades pelas quais os produtos gênicos são sintetizados e degradados. Grande parte dessa regulação ocorre ao nível da transcrição, sendo mediada por proteínas reguladoras, que reprimem ou ativam a transcrição. Fatores de transcrição são proteínas que reconhecem o DNA de maneira seqüência-específica e regulam a freqüência de iniciação da transcrição pela ligação em sítios específicos no promotor de genes-alvo. O controle da transcrição é fundamental porque é nesta etapa que se pode garantir que compostos desnecessários não sejam formados (NELSON; COX, 2005). Os fatores de transcrição são polipeptídeos que atuam no início, durante a

elongação e no término da transcrição, ativando ou desativando o gene. O controle da transcrição normalmente é feito na sua etapa inicial.

As proteínas MYB compõem famílias de fatores de transcrição encontradas tanto em plantas como em animais, nestes, porém, com menor ocorrência (MEHRTENS et al., 2005) e com domínios de ligação diferentes (ROSINSKI, 1998). Elas se caracterizam por conter três repetições (R1R2R3) imperfeitamente conservadas de aproximadamente 50 aminoácidos, com três resíduos de triptofanos (Trp) espaçados regularmente, formando um grupamento de Trp na estrutura tridimensional da proteína (SAIKUMAR et al., 1990; OGATA et al., 1992). Cada repetição codifica três α -hélices, sendo que as duas últimas formam a região de ligação ao DNA denominado hélice-volta-hélice (helix-turn-helix, HTH), onde os Trp conservados na terceira hélice contribuem para o centro hidrofóbico na estrutura de ligação do DNA (OGATA et al., 1992; KANEI-ISHII et al., 1990).

Os fatores de transcrição da família MYB são exclusivos de seres eucariontes; nos animais eles são responsáveis pelo controle da divisão e diferenciação celular. Em plantas eles apresentam diversas funções: estão envolvidos na rota metabólica de síntese de flavonóides, desenvolvimento de sementes, resposta ao estresse ambiental, ataque de patógenos, entre outros (STRACKE; WERBER; WEISSHAAR, 2001).

Essas proteínas são divididas em subfamílias, de acordo com o número de repetições da região imperfeitamente conservada. As proteínas que contêm uma repetição são ditas MYB1R, com duas repetições R2R3-MYB, e com três repetições MYB3R; sendo que a subfamília com duas repetições (R2R3-MYB) é a que representa a maior família de genes MYB em plantas (STRACKE; WERBER; WEISSHAAR, 2001). Em *A. thaliana*, 126 diferentes genes do tipo R2R3-MYB foram identificados (YANHUI et al., 2006), mas somente alguns tiveram suas funções caracterizadas.

Diversos processos celulares são controlados pelos fatores de transcrição MYB, como transdução de sinal (URAO et al., 1993), resistência de plantas a doenças (VAILLEAU et al., 2002), divisão celular (HIRAYAMA; SHINOZAKI, 1996) e metabolismo de compostos secundários, como os flavonóides (BOREVITZ et al., 2000; COMINELLI et al., 2008).

A subfamília de fatores de transcrição R2R3-MYB está diretamente envolvida na síntese de flavonóides (STRACKE; WERBER; WEISSHAAR, 2001;

STRACKE et al., 2007; LEPINIEC et al., 2006). Cada repetição adota uma estrutura hélice-volta-hélice que interage com elementos regulatórios no promotor, enquanto a região C-terminal é responsável pelas interações proteína-proteína com outros componentes do sistema transcripcional (YANHUI et al., 2006).

Em videiras, os genes *myb* já caracterizados em *Vitis vinifera* estão envolvidos no controle da síntese de flavonóides. Foi reportado o aumento do acúmulo de antocianinas em casca de uvas (*V. vinifera*) pelo tratamento com o hormônio ABA, que intensificou o acúmulo de *VvmybA1*, um gene regulatório putativo de biossíntese de antocianina em uvas (JEONG et al., 2004). A formação de proantocianidinas é regulada pelo gene *VvMYBPA1* e a alteração na sua expressão pode interferir na quantidade e composição desses flavonóides (BOGS et al., 2007). A expressão de *VvMYB5b* foi observada em flores e nos primeiros estágios de desenvolvimento da fruta, tanto nas sementes como nos tecidos da casca, podendo assim estar relacionado à biossíntese dos antioxidantes fenólicos catequina e epicatequina (DELUC et al., 2008)

MYB12 mostrou-se um ativador específico de biossíntese de flavonóides de *A. thaliana* em fase de desenvolvimento. Foi também observada similaridade funcional entre MYB12 e seu homólogo em milho, ZmP, indicando que fatores de transcrição MYB similares apresentam funções similares mesmo entre diferentes espécies (MEHRTENS et al., 2005).

A caracterização do fator *MdMYBA*, presente em casca de maçã (*Malus domestica*), demonstrou que este é um gene regulatório fundamental na biossíntese de antocianina. Sua expressão foi mais significativa em cultivares mais avermelhados, além de induzir o acúmulo de antocianina em tecidos reprodutivos de tabaco transgênico. A produção de antocianinas também foi induzida por irradiação UV e tratamento a baixas temperaturas (BAN et al., 2007).

Os genes *AtPAP1* (*AtMYB75*) e *AtPAP2* (*AtMYB90*) estão associados à regulação do metabolismo de fenilpropanóides. A superexpressão desses resultou no acúmulo de antocianinas em *A. thaliana* (BOREVITZ et al., 2000). *AtMYB30* é um importante regulador da resposta hipersensitiva (morte celular) ao ataque de patógenos bacterianos em *Arabidopsis* (VAILLEAU et al., 2002).

A análise da expressão dos genes *LjMYB101*, *LjMYB102* e *LjMYB103* de *Lotus japonicus*, e do ortólogo *GmMYB101*, de *Glycine max* (soja), todos da família das R2R3-MYB, mostrou que o perfil de expressão órgão-específico e de regulação

de nitrato de MYB101 foi bastante similar ao de CHS nas duas plantas. Isso indica o papel do MYB101 na regulação da biossíntese de flavonóide em resposta a condições limitadas de nitrato (MIYAKE et al., 2003).

Resíduos de cisteína presentes nos fatores de transcrição MYB tanto de animais como de plantas podem afetar sua ligação ao DNA e conseqüente atividade transcripcional. Em plantas, os dois resíduos presentes nos domínios R2R3-MYB formam uma ligação dissulfeto sob condições não-redutoras, impedindo a ligação ao DNA (HEINE; HERNANDEZ; GROTEWOLD, 2004). O primeiro resíduo de cisteína, presente somente em plantas, é determinante para função do MYB, e os resíduos adjacentes a essas cisteínas são altamente similares nos domínios MYB analisados de uvas (MATUS; AQUEA; ARCE-JOHNSON, 2008), destacando-se assim a importância de se manterem conservados.

1.6 Flavonóides

Os metabólitos secundários são compostos que conferem características adaptativas às plantas. Essas substâncias participam diretamente das interações bioquímicas entre plantas e organismos (SALISBURY; ROSS, 1992). Dentre os metabólitos secundários presentes em alimentos como vegetais e frutas, os antioxidantes são os mais comuns, e têm efeitos benéficos para a saúde humana. São comumente utilizados na prevenção e tratamento de doenças, além de diversas aplicações tecnológicas, como aditivos em alimentos (LEPINIEC et al., 2006).

Flavonóides são metabólitos secundários aromáticos, antioxidantes, que desempenham importante função nas relações entre vegetais e o ambiente. Estão envolvidos nos mecanismos de defesa da planta contra condições não favoráveis ao seu desenvolvimento, como em estresses abióticos, deficiência de nutrientes, baixas temperaturas e na resposta ao ataque microbiano em plantas sob a forma de fitoalexinas. Também estão envolvidos na pigmentação de flores e frutas, na capacidade de resistência à radiação UV-B e na regulação do transporte de auxina, um hormônio vegetal regulador do crescimento de alguns tecidos, além de influenciarem a qualidade agrônômica e industrial dos produtos vegetais

(HARBORNE; WILLIAMS, 2000; PIETTA, 2000; WINKEL-SHIRLEY, 2002; MEHRTENS et al., 2005; LEPINIEC et al., 2006). Cerca de 6000 diferentes flavonóides já foram identificados em plantas (HARBORNE; WILLIAMS, 2000), tendo suas diversas funções já caracterizadas.

Os flavonóides são subdivididos em diferentes classes que incluem flavonóis, flavonas, flavanóis e antocianinas, de acordo com o nível de oxidação do anel aromático. A grande diversidade desses compostos já caracterizados em plantas deve-se a diferentes fatores, como a estereoespecificidade, o grau de polimerização e as ligações entre suas unidades básicas (LEPINIEC et al., 2006). Grande parte dos flavonóides é encontrada em sementes e cascas (SHIRLEY, 1998), no entanto, o tipo, quantidade e localização desses flavonóides variam de acordo com a espécie da planta e o estágio de desenvolvimento dos tecidos, podendo ser modulados por sinalização do ambiente (LEPINIEC et al., 2006).

As antocianinas são pigmentos da classe dos flavonóides que estão presentes em diversos vegetais. A rota de biossíntese de antocianinas envolve enzimas como PAL e CHS. Um esquema representativo da rota de biossíntese de flavonóides é mostrado na Figura 1.5.

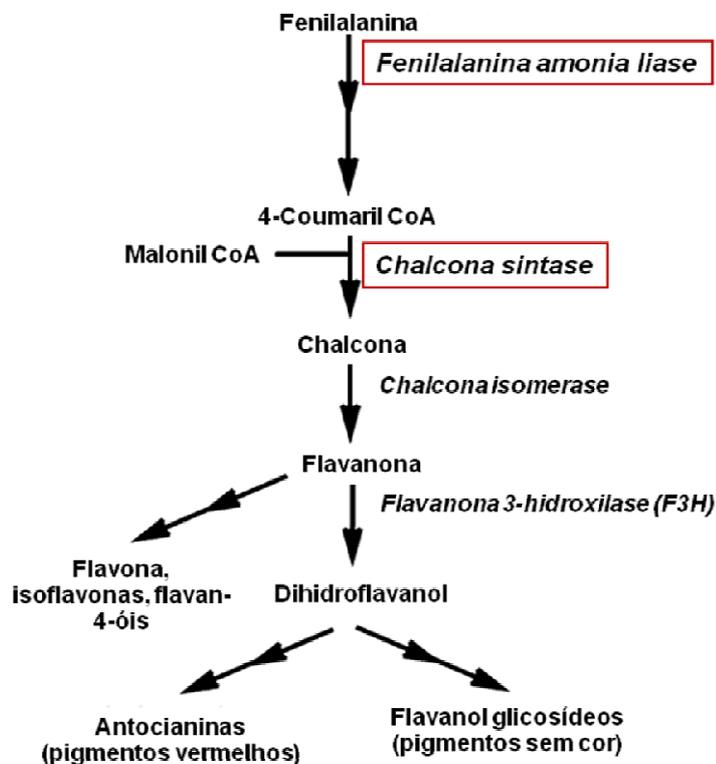


Figura 1.5: Esquema representativo da rota biossintética de flavonóides. Fonte: RANGARAJAN et al. (2004).

Proteínas regulatórias que controlam o acúmulo de antocianinas já foram bem caracterizadas em uma grande variedade de vegetais, e em sua maioria fazem parte das famílias MYB e bHLH (basic Helix-Loop-Helix), os dois maiores grupos de proteínas regulatórias em plantas (STRACKE; WERBER; WEISSHAAR, 2001).

Os genes estruturais das enzimas de síntese de antocianinas foram clonados e os genes dos fatores de transcrição que os regulam foram identificados em diversas espécies, como *Malus domestica* (HONDA et al., 2002), o que possibilitou a verificação de correlação entre níveis de transcritos e acúmulo de antocianinas. Fatores de transcrição da família R2R3-MYB regulam a via de síntese de antocianinas, modulando o desenvolvimento da coloração vermelha na casca da maçã (BAN et al., 2007).

1.7 Glutathiona

Glutathiona (GSH) é um tripeptídeo tiólico formado por γ -Glu-Cys-Gly. Sua via de biossíntese envolve duas reações ATP-dependentes subsequentes que iniciam com a síntese de γ -glutamilcisteína (γ -EC) a partir de L-glutamato e L-cisteína e catalisada por γ -glutamilcisteína sintetase (γ -ECS), seguida pela formação de GSH pela adição de glicina ao carbono C-terminal de γ -EC com a ação da enzima glutathiona sintetase (GSH-S; Figura 1.6) (NOCTOR et al., 1998).

Entre os diversos compostos antioxidantes encontrados em folhas, a glutathiona é a mais fortemente relacionada à tolerância a estresses abióticos, como o frio (GOMEZ et al., 2004), particularmente em milho (KOCSY et al., 2001). Além disso, está envolvida na sinalização redox, na modulação da atividade enzimática, no controle do desenvolvimento de raízes e no processo de modificação e transporte de hormônios e outros compostos endógenos e exógenos pela formação de glutathiona S-conjugados (NOCTOR et al., 1998; GOMEZ et al., 2004).

Glutathiona é objeto de muitos estudos sobre tolerância ao estresse em plantas devido às suas conhecidas funções nos sistemas vegetais envolvendo estresses bióticos e abióticos. Frequentemente se observa o estímulo da biossíntese

de GSH sob condições de estresse. Da mesma forma, o acúmulo de GSH pode compensar reduções de outros antioxidantes (NOCTOR et al., 1998)

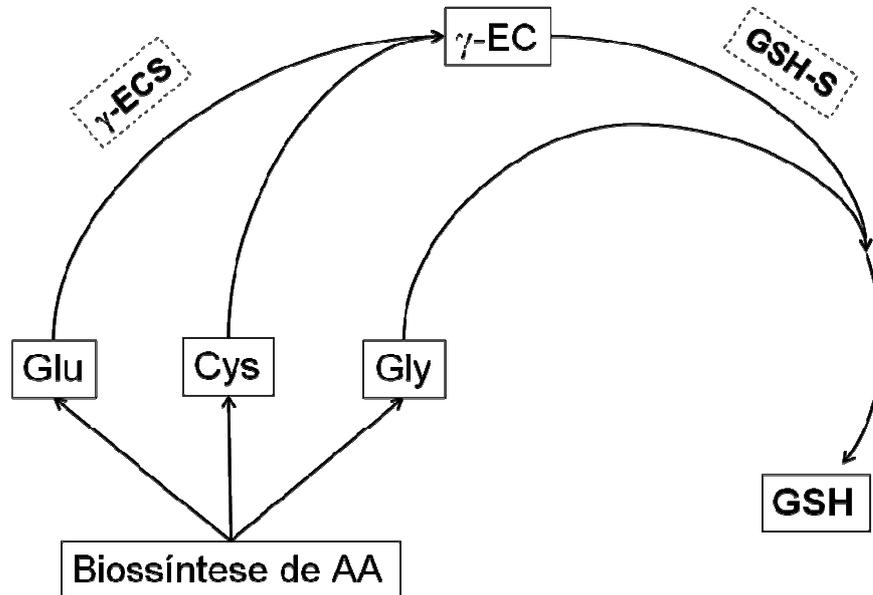


Figura 1.6: Esquema da síntese de glutathiona reduzida (GSH) a partir dos aminoácidos constituintes (Glu, glutamina; Cys, cisteína; Gly, glicina). γ -ECS: γ -glutamilcisteína sintetase; GSH-S: glutathiona sintetase; γ -EC: γ -glutamilcisteína; AA: aminoácidos. Adaptado de: ARISI et al. (1997).

1.8 Milho

Milho (*Zea mays*) é uma espécie pertencente à família Poacea (Gramineae), originado aproximadamente de sete a dez mil anos atrás no México e na América Central. É uma das plantas cultivadas mais antigas e mais estudadas, possuindo caracterização genética bastante detalhada.

Brasil é um grande produtor de milho, apresentando uma área plantada de cerca de 8,7 milhões de hectares na primeira safra (período 2009/2010), segundo o levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) (EMBRAPA, 2008). O Brasil colheu uma safra recorde de milho de 58,5 milhões de toneladas em

2007/2008, mas o custo operacional para produção de milho subiu 18,4% no último ano devido principalmente ao aumento de custos de fertilizantes e sementes.

Sua importância econômica é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vão desde a alimentação animal e humana, até sua utilização na indústria de alta tecnologia. Significante fonte de energia presente na alimentação humana, o milho é fonte de vitamina A, vitaminas do complexo B, cálcio, ferro e fósforo, além de ser rico em carboidratos e fibras. Devido às suas propriedades nutricionais, este cereal complementa a alimentação tanto *in natura* como processado, sob a forma de farinha, fubá, xarope e flocos de milho. É a principal matéria-prima de vários pratos consumidos no Brasil como bolos, polenta, canjica, pipoca, cuscuz, mingaus, pamonha entre outros. Além de poder ser consumido diretamente, é utilizado na indústria para a fabricação de balas, biscoitos, pães, chocolates, geléias, sorvetes, maionese e cerveja (ABIMILHO, 2010). No entanto, o uso do milho em grão como alimentação animal representa a maior parte do consumo desse cereal (EMBRAPA, 2008).

Além de ser a base da alimentação da população mundial, e de sua indiscutível importância econômica, o milho é amplamente utilizado como planta-modelo em diversas abordagens científicas. O crescimento do mesocótilo de milho em presença de UV-B é modulado pelo NO (JANSEN et al., 1998; AN, 2005), assim como a ativação do sistema antioxidante para proteger a planta do estresse oxidativo gerado por UV-B e pela seca (SHI et al., 2005; AN, 2005; ZHANG et al., 2007). O conteúdo de clorofila e da densidade de cloroplasto na membrana de plantas de milho crescidas em baixas concentrações de ferro também é modulado por NO (GRAZIANO; BELLIGNI; LAMATTINA, 2002; LAMATTINA et al., 2003). O milho é uma planta bastante sensível a condições de baixa temperatura. Entre os genes que estão diretamente envolvidos no processo de resposta a baixas temperaturas em milho, estão os genes codificadores das duas enzimas responsáveis pela síntese de glutathione (GOMEZ et al., 2004).

1.9 Araucária

A. angustifolia, também conhecida como pinheiro-brasileiro ou pinheiro-do-paraná é uma conífera nativa do Sul do Brasil que possui grande importância econômica e ecológica, e é o principal componente da Floresta de Araucária sendo a única espécie de seu gênero com ocorrência natural no Brasil (GUERRA et al., 2002; MANTOVANI, 2004).

Sua distribuição geográfica compreende regiões pertencentes à parte leste e central do planalto sul brasileiro, nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, podendo também ocorrer esparsamente nas regiões sudeste e centro oeste (AQUINO, 2005).

A araucária é utilizada como fonte alimentar e de renda para as populações locais. Sua semente, o pinhão, é comestível e muito apreciada no Sul do país. O pinhão é constituído basicamente de amido, apresenta significativo valor nutricional, sendo rico em vitaminas do complexo B, cálcio, fósforo e proteínas (GUERRA et al., 2002).

A intensa exploração da araucária, cuja madeira é de grande importância comercial, tem levado essa espécie, e conseqüentemente seu ecossistema, à extinção. Estudos sobre o melhoramento e o desenvolvimento, visando à preservação da *A. angustifolia* são de extrema importância e têm sido realizados objetivando sua preservação. Esses estudos tratam desde aspectos ambientais, como solo e clima, até alternativas biotecnológicas para manutenção e propagação da espécie. Técnicas de cultivo *in vitro* têm sido utilizadas para desenvolvimento de espécies ameaçadas de extinção. As poucas tentativas de reflorestamento têm apresentado resultados pouco significativos no que diz respeito ao seu crescimento (GUERRA et al., 2002).

A embriogênese somática de araucária tem sido estudada como alternativa para sua propagação. O conhecimento dos eventos que ocorrem durante o desenvolvimento inicial do embrião somático é fundamental para aumentar a eficiência dos protocolos de embriogênese de araucária (SILVEIRA et al., 2002; 2006, BALBUENA et al., 2009). SILVEIRA et al. (2006) observaram que o tratamento de células embrionárias de araucária com PUT levou ao aumento da liberação de NO e propuseram que a síntese está relacionada a manutenção da polaridade do

embrião somático de araucária. O envolvimento de poliaminas na liberação de NO durante a embriogênese somática de alguns sistemas já foi estudado (SILVEIRA et al., 2006; SANTA-CATARINA et al., 2007).

Fatores de transcrição da família MYB relacionados à síntese de flavonóides e a outros compostos envolvidos na resposta hipersensitiva já foram largamente estudados e foi demonstrado serem modulados por NO em diversos sistemas vegetais; araucária pode ser um modelo de estudo desses fatores de transcrição.

CAPÍTULO 2

ÓXIDO NÍTRICO EXÓGENO MODULA A SÍNTESE DE GLUTATIONA EM FOLHAS DE *Zea mays*

Carla Souza Mello, Ana Carolina Maisonnave Arisi*

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

* Autor para correspondência: Tel. +554837215382, Fax: +554837219943

E-mail: arisi@cca.ufsc.br

Resumo

Para investigar o possível envolvimento de óxido nítrico (NO) na regulação gênica da rota de síntese de glutatona e flavonóides, plântulas de milho foram tratadas com nitroprussiato de sódio (SNP), um doador de NO, e apocinina (APO), um indutor da produção de NO. Os transcritos de γ -glutamylcisteína sintase (γ -*ecs*), glutatona sintase (*gsh-s*), chalcona sintase (*chs*), fenilalanina amônia liase (*pal.1*), proteína P relacionada a myb (*P1*) e actina (*act*) foram quantificados em folhas de milho, após 12 h de tratamento, por PCR em tempo real. Os níveis de transcritos de γ -*ecs* e *gsh-s* em folhas de milho aumentaram 9,5 e 12,4 vezes sob tratamento com SNP, respectivamente, enquanto, após tratamento com APO, os transcritos γ -*ecs* e *gsh-s* apresentaram valores de 0,8 e 3,5 vezes em relação às plantas controle. Folhas tratadas com SNP não apresentaram mudanças significativas de expressão de *chs* e *pal*. Nossos experimentos mostraram que a síntese de glutatona pode ser modulada por NO exógeno em folhas de milho.

Palavras-chave: apocinina, glutatona, óxido nítrico, nitroprussiato de sódio, expressão gênica.

Introdução

Óxido nítrico (NO) desempenha importante função na modulação de diversas funções fisiológicas e bioquímicas como uma molécula gasosa sinalizadora em plantas. NO pode interagir diretamente com constituintes celulares como proteínas e espécies reativas de oxigênio (ROS), embora a interação ROS/NO possa ser citotóxica ou protetora dependendo das concentrações relativas de ROS/NO (BELIGNI et al., 2002). NO pode estar envolvido no aumento do teor de antioxidantes e na atividade de enzimas antioxidativas em plantas (HSU; KAO, 2004; INNOCENTI et al., 2007). Ele pode atuar como uma molécula sinalizadora em uma série de eventos que resultam na variação da expressão gênica (LAMATTINA et al., 2003; PAGNUSSAT et al., 2002; WILSON; NEILL; HANCOCK, 2008). A S-nitrosilação de proteínas por NO parece ser um mecanismo importante na regulação da atividade de fatores de transcrição (GRÜN et al., 2006; SERPA et al., 2007). Estudos de transcriptômica indicam que genes regulados por NO sustentam uma grande diversidade de funções celulares, em concordância com seu papel pleiotrópico na fisiologia vegetal (POLVERARI et al., 2003; PARANI et al., 2004).

Modificações na expressão gênica em resposta ao tratamento com 0,1 e 1,0 mM de nitroprussiato de sódio (SNP), um doador de NO, foram estudadas em *Arabidopsis* através de microarranjo com genes ATH1, e os autores observaram indução de 342 genes e repressão de 80 genes em resposta ao tratamento com NO (PARANI et al., 2004). SNP é identificado como um doador de NO (FLORYSZAK-WIECZOREK et al., 2006) capaz de liberar essa molécula quando induzido por luz (Wang et al., 2002). Apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona; acetovanilona), APO, é um catecol metoxi-substituído que aumenta os níveis de NO em folhas de plântulas de milho (TOSSI; CASSIA; LAMATTINA, 2009). A produção de NO induzida pela APO em folhas de milho foi significativamente reduzida por N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor de atividade de NO sintase (NOS) e 2-(4-carboxi-fenil)-4,4,5,5-tetra-metil-imidazolina-1-oxil-3-óxido (c-PTIO), um seqüestrador específico de NO (TOSSI; CASSIA; LAMATTINA, 2009).

Glutationa (GSH; γ -glutamilcisteinilglicina) é um tiol tripeptídico de baixo peso molecular amplamente encontrado em espécies vegetais. A síntese de glutathiona acontece em dois passos dependentes de ATP, através de reações

catalisadas por γ -glutamilcisteína sintetase (γ -ECS) e glutathiona sintetase (EC 6.3.2.3: GSH-S), sendo γ -ECS a enzima limitante (ARISI et al., 1997; NOCTOR et al., 1998). Análises do nível de expressão de γ -ECS e GSH-S após tratamento com SNP e nitrosoglutationa (GSNO) mostraram que os genes *γ -ecs* e *gsh-s* são induzidos por tratamento com NO em raízes de *Medicago truncatula* (INNOCENTI et al., 2007).

Flavonóides, derivados da estrutura de fenilpropanóides, desempenham importantes funções nas interações de plantas com o ambiente (LEPINIEC et al., 2006). Genes envolvidos na síntese de flavonóides são regulados durante o desenvolvimento da planta e também em resposta a estresses bióticos e abióticos (SCHIJLEN et al., 2004). A biossíntese de flavonóides inicia com uma etapa enzimática catalisada pela chalcona sintase (CHS). A fenilalanina amônia liase (PAL) é a enzima precursora na rota biossintética de fenilpropanóides. SNP gerou rápida indução de ambos transcritos (*chs* e *pal*) em extratos celulares de soja (DELLEDONE et al., 1998). Além disso, NO exógeno aumentou a atividade de PAL em folhas de tabaco (DURNER; WENDEHENNE; KLESSIG, 1998) e em calos de *Ginkgo biloba* (HAO; SUN; CAI, 2009). Pericarp color 1 (P1) é um regulador transcripcional relacionado a proteínas MYB envolvido na biossíntese de flavonóides em milho (GROTEWOLD et al., 1998; HEINE et al., 2007).

O objetivo do presente trabalho foi verificar a influência de SNP, um doador de NO, e de apocinina, um indutor de NO, na expressão gênica do gene de actina e de genes envolvidos na síntese de glutathiona (*γ -ecs* e *gsh-s*) e de fenilpropanóides (*chs*, *pal.1* e *P1*).

Metodologia

Plantas e condições de cultivo

Sementes de milho cultivar SHS 3031 (gentilmente cedidas por Santa Helena Sementes, Brasil) foram esterilizadas superficialmente com hipoclorito de

sódio a 0,5% por 20 min e lavadas três vezes com etanol 70%, e então enxaguadas com água destilada. As sementes foram germinadas em papel filtro umidificado a 25°C no escuro. Sementes germinadas foram então transferidas para sementeiras contendo uma mistura de solo:vermiculita (3:1 v/v) e mantidas em estufa (câmara de crescimento controlado) com período de 14h de luz a 25°C para crescimento durante 14 dias, sendo regada semanalmente com solução nutritiva Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950), composta por macro e micronutrientes necessários ao desenvolvimento da planta. As plântulas de milho desenvolvidas foram cuidadosamente cortadas na base e colocadas em água destilada por 1h. As plântulas foram então tratadas por 12h com água destilada (tratamento controle), 100 µM APO, 100 µM APO em combinação com 100 µM L-NAME, 100 µM SNP ou 100 µM ferricianeto de potássio (FeCN). A terceira folha de cada planta foi coletada e mantida a -80°C para análises. Foram realizados três experimentos independentes e duas plantas de cada tratamento foram usadas para extração de RNA.

Extração de RNA e síntese de cDNA

Aproximadamente 75 mg de cada planta foram usados para extração de RNA total usando RNAqueous Kit e Plant Isolation Aid (Ambion, Applied Biosystems) de acordo com orientações do fabricante. O RNA isolado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio e sua concentração foi determinada utilizando o NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies). A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando 2 µg de RNA isolado, 0,5 µg iniciadores oligo(dT)₁₈, 0,5 µg iniciadores randômicos, 1 mM dNTP mix, 40 U RNasin Ribonuclease Inhibitor, 1X AMV Reverse Transcriptase Reaction Buffer e 30 U da enzima AMV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, EUA).

PCR em tempo real

Oligonucleotídeos gene-específicos foram desenhados com o auxílio do programa Primer Express v 3.0 (Applied Biosystems) e utilizados para as reações de PCR em tempo real (Tabela 2.1). A padronização das reações foi previamente estabelecida através de curvas de calibração para ajuste da concentração dos iniciadores e de cDNA utilizado. O ajuste das concentrações de iniciadores foi determinado através de testes combinando-se concentrações de 50, 300 e 900 nM de iniciadores senso e anti-senso testados com 1 e 10 ng de cDNA molde. Uma vez estabelecida a concentração de 300 nM para os iniciadores, foram então testadas as concentrações de cDNA a serem utilizadas na análise de cada gene. Para isso foram feitas curvas de calibração com cada par de iniciadores a 300 nM, como por exemplo para α -tubulina (Figura 2.1). Os cDNAs foram diluídos de forma seriada de 10^2 a 10^{-3} ng e, a partir das curvas obtidas, a concentração escolhida para as análises foi de 10 ng.

Tabela 2.1: Oligonucleotídeos utilizados para RT-PCR em tempo real.

Gene	Iniciadores	Tamanho do fragmento	Referência	Número de acesso
α -tubulina	TUB GCGCACCATCCAGTTCGT CTGGTAGTTGATTCCGCACTTG	60	Sui, 2008	X73980
Gamaglutamil cisteína sintetase	γ -ECS TTCTTGGGCTTGGCTTTCA TTCCCTTTGGCATTATTGGTATGT	62	Gomez, 2004	AJ302783
Glutathiona sintetase	GSH-S GCTCCCAGCACATTTTCCA GAAATCCCGTCCATGCTAACA	99	Gomez, 2004	AJ302784
Chalcona sintase	CHS CGTCCGTCCGCAAATAATGT ATGATGATTGTGCGACTGACAGT	99	Schijlen, 2004	CA851897
Pericarp color1	P1 AACGCTCCCACGACAATCA GGCACGCACCTAAAGCAGAA	101	Grotewold, 1994	NM_001111873
Fenilalanina amônia liase	PAL1 CTCTTCGTTGTTGATTTTTGGTTGT AGAAAGAGCAACGCCACACA	71	Keith, 1993	M95077
Actina	ACT GCAGCATGAAGGTTAAAGTGATTG GCCACCGATCCAGACACTGT	61	Heine, 2007	NM_001155179.1

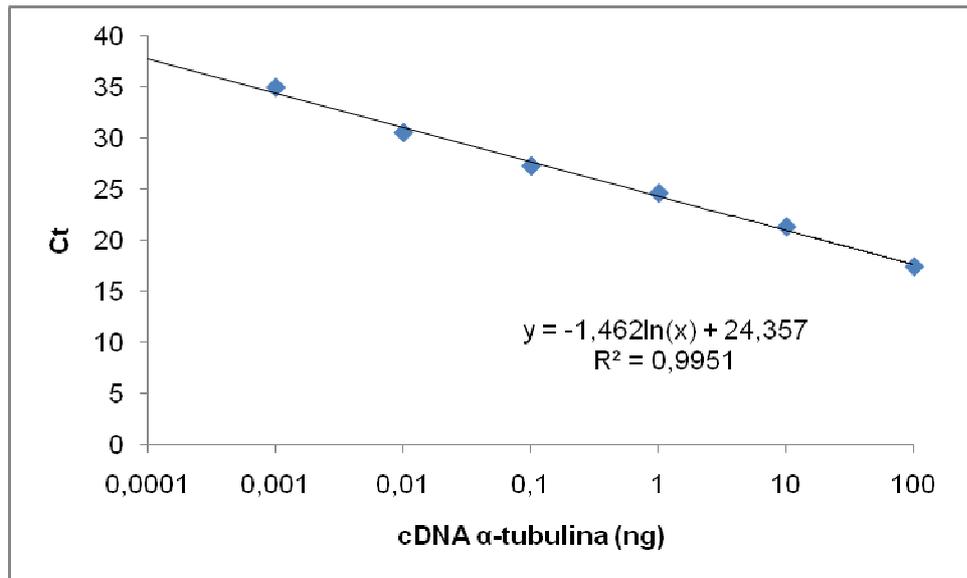


Figura 2.1: Curva de calibração para α -tubulina com 6 concentrações de cDNA diluídas de forma seriada a partir de 10^2 ng.

As análises foram então realizadas através de curvas padrão relativas, construídas para cada gene-alvo comparado com o gene constitutivo (α -tubulina). As reações foram realizadas utilizando 5 μ L SYBR Green I PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 300 nM de cada iniciador e 2 μ L de cDNA molde (10 ng). Todas as reações de PCR em tempo real (padrões, amostras desconhecidas e controles negativos) foram realizadas em triplicatas em poços adjacentes na mesma placa. Reações de amplificação foram realizadas com uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 10 min seguida por 40 ciclos a 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Imediatamente após cada corrida, foi gerada uma curva de dissociação a 95°C por 1 min e 60°C por 1 min. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no sistema ABI PRISM® 7500 Detection System (Applied Biosystems).

Análise estatística

O experimento foi realizado em três repetições biológicas com duas plantas por tratamento (n=6). Os dados foram analisados pela análise de variância (one-way ANOVA) e comparados pelo teste F. As médias foram comparadas através do teste de Tukey. A análise dos dados foi feita com o auxílio do *software* Statistica ® 7 (StatSoft Inc.f, Tulsa, OK, EUA). Diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Para investigar um possível envolvimento de NO na regulação gênica nas rotas de biossíntese de glutathiona e de flavonóides, plântulas de milho foram tratadas com SNP, um doador de NO, e APO, um indutor da produção de NO. Os transcritos de γ -glutamylcisteína sintetase (*γ -ecs*), glutathiona sintetase (*gsh-s*), chalcona sintase (*chs*), fenilalanina amônia liase (*pal.1*), pericarp color 1 (*P1*) e actina (*act*) foram quantificados em folhas de milho após 12 h de tratamento por PCR em tempo real usando curva relativa padrão com α -tubulina como transcrito padrão (Figura 2.2). Modificações na expressão gênica foram estimadas em relação ao nível de expressão das plantas controle, tratadas com água. As plantas foram também tratadas com o produto de degradação do SNP, o FeCN, que é incapaz de liberar NO (PARANI et al. 2004), e com APO em combinação com L-NAME, um inibidor de atividade de NOS dependente de L-arginina (WILSON; NEILL; HANCOCK, 2008). A produção de NO induzida por APO foi extremamente reduzida por L-NAME em folhas de milho (TOSSI; CASSIA; LAMATTINA, 2009).

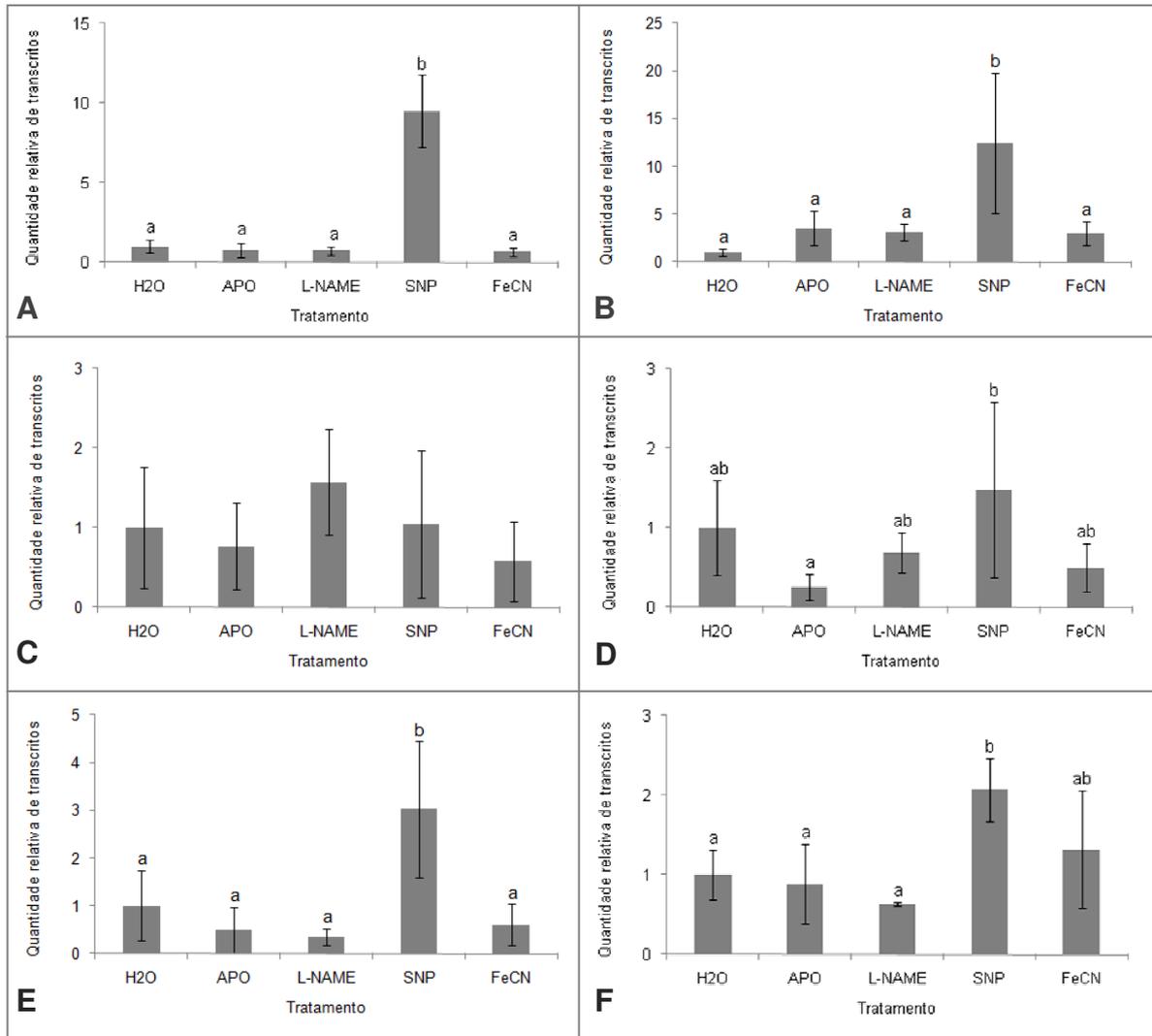


Figura 2.2: Análise de expressão de A) γ -glutamyl cisteína sintetase *γ -ecs*, B) glutationa sintetase **gsh-s**, C) fenilalanina amônia liase **pal.1**, D) chalcona sintase **chs**, E) Proteína P relacionada a myb **P1** e F) actina 1 **act** em folhas de milho tratadas. Plântulas com 14 dias tratadas por 12 h com água (H2O), apocinina (APO), apocinina e N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), nitroprussiato de sódio (SNP) e ferricianeto de potássio (FeCN) foram usadas para análise quantitativa por RT-PCR em tempo real. Quantidades relativas de transcritos foram calculados usando α -tubulina como padrão. Dados são apresentados como média \pm DP (n = 6), e letras diferentes indicam valores significativamente diferentes pelo teste de Tukey ao nível de significância de p<0,05.

O nível de transcritos de γ -ecs em folhas de milho tratadas com SNP apresentaram um aumento de $9,5\pm 2,3$ vezes em relação ao grupo controle. Para os outros tratamentos, as quantidades de transcritos foram de $0,8\pm 0,5$ para tratamento APO, $0,7\pm 0,3$ para FeCN e $0,6\pm 0,3$ para L-NAME em comparação com as plantas controle (Figura 2.2A). Quanto à expressão de *gsh-s*, foi observado um aumento na quantidade de transcritos para todos os tratamentos, sendo $12,4\pm 7,3$ vezes para SNP, $3,5\pm 1,8$ para APO, $3,1\pm 0,9$ para L-NAME e $3,0\pm 1,2$ para FeCN (Figura 2.2B). Transcritos e proteínas γ -ECS e GSH-S foram encontrados tanto no limbo foliar como no mesófilo de folhas de milho sob condições ótimas (GOMEZ et al., 2004). Semelhante aos nossos resultados, os níveis de transcritos de γ -ecs e *gsh-s* aumentaram 3 e 8 vezes, respectivamente em raízes de *Medicago trunculata* tratadas com SNP (INNOCENTI et al., 2007).

Os níveis de transcritos de *pal.1* observados foram $0,8\pm 0,5$ para APO, $1,6\pm 0,7$ para L-NAME, $1,0\pm 0,9$ para SNP e $0,6\pm 0,5$ para FeCN (Figura 2.2C), sendo que não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). Os transcritos de *chs* tiveram a expressão de SNP aumentada em $1,5\pm 1,1$ vezes e reduzida nos demais tratamentos, sendo $0,3\pm 0,2$ para APO, $0,7\pm 0,3$ para L-NAME e $0,5\pm 0,3$ para FeCN (Figura 2.2D). Diferente de nossos resultados, a expressão de *pal.1* foi induzida em folhas de tabaco tratadas com NO (DURNER; WENDEHENNE; KLESSIG, 1998) e houve aumento na expressão dos transcritos *chs* e *pal* quando suspensões celulares de soja foram tratadas com SNP (DELLEDONNE et al., 1998). A atividade de PAL de discos foliares de gerânio foi ativada por SNP sob luz, mas não no escuro. Discos foliares dessa planta tratados com $100 \mu\text{M}$ de SNP aumentaram a atividade de PAL de 1 a 24 h após o início do tratamento em condições de luz (FLORYSZAK-WIECZOREK et al., 2006).

Com os transcritos de *P1* foram observadas quantidades elevadas sob tratamento com SNP ($3,0\pm 1,4$) e reduzidas sob os outros tratamentos, sendo $0,5\pm 0,4$ para APO, $0,4\pm 0,2$ para L-NAME e $0,6\pm 0,4$ para FeCN (Figura 2.2E). Os níveis de transcritos de *act* aumentaram $2,1\pm 0,4$ vezes no tratamento com SNP e foram de $0,9\pm 0,5$ para APO, $0,6\pm 0,0$ para L-NAME e $1,3\pm 0,7$ para FeCN (Figura 2.2F).

TOSSI, CASSIA e LAMATTINA (2009) observaram que APO mostrou-se um potente indutor da produção de NO em folhas de plântulas de milho e a produção máxima de NO foi observada após 12 h de tratamento com APO em concentração

de 100 μ M. Esses autores demonstraram que APO induziu o acúmulo de NO em plântulas de milho de maneira diferente da inibição de NADPH oxidase, além de conferir tolerância ao estresse oxidativo produzido por radiação UV-B ou por H₂O₂. Em nosso experimento as mesmas condições de tratamento foram aplicadas, e APO induziu a expressão de *gsh-s* (Figura 2.2B), porém também causou inibição na expressão em folhas de milho de *chs* (Figura 2.2D) e de *P1* (Figura 2.2E), genes envolvidos na síntese de NO. Essa inibição pode ter sido causada pelo fato de não ter havido indução da produção de NO nas folhas de milho tratadas com APO, não tendo, assim, elevado o número de transcritos.

O doador de NO mais comumente empregado é o SNP, que libera NO⁺. A solução de SNP é extremamente sensível à luz e sua degradação é causada também pela exposição ao oxigênio e a altas temperaturas. O mecanismo de liberação de NO a partir de SNP não é exatamente clara, mas sabe-se que requer iluminação ou a redução de um elétron (WANG et al., 2002). A meia-vida de SNP medida em solução foi de 12 h (FLORYSZAK-WIECZOREK et al., 2006). Em nossos experimentos, após 12 h de tratamento, SNP induziu a expressão de todos os transcritos testados, sendo significativamente expressos ambos transcritos relacionados à síntese de glutathiona, γ -*ecs* e *gsh-s* (Figuras 2.2A e 2.2B), além do transcrito da proteína relacionada a myb, pericarp color P, *P1* (Figura 1E). O produto de degradação de SNP, FeCN, não induziu a expressão de γ -*ecs*, *chs* e *P1*. Apesar disso, FeCN causou aumento nos níveis de transcritos de *gsh-s*, sendo um aumento menor (3 vezes) do que o causado pelo tratamento com SNP (12,4 vezes). Deste modo, o aumento observado nos níveis de transcritos de γ -*ecs*, *gsh-s* e *P1* após 12 h de tratamento com SNP pode ser atribuída a liberação de NO. Por outro lado, folhas tratadas com SNP não mostraram mudanças significativas na expressão de *pal.1* e *chs* (Figuras 2.2C e 2.2D).

O uso de APO foi proposto como uma abordagem alternativa ao estudo da funcionalidade do NO em plantas (TOSSI; CASSIA; LAMATTINA, 2009), e poderia ser um modo interessante de discriminar o efeito em relação aos efeitos de NO exógeno, uma vez que este é um indutor de NO endógeno. Além disso, o NO⁺ exógeno liberado pela transição de SNP a metal complexo apresentou efeitos diferentes ou até opostos a outros doadores de NO, como SNAP, GSNO, NOC-18 (MURGIA et al., 2004a).

Neste trabalho foi demonstrado que SNP é capaz de induzir significativamente a expressão de genes responsáveis pela síntese de enzimas da rota biossintética de glutathiona (*γ-ecs* e *gsh-s*) e também de um gene envolvido na expressão de um fator de transcrição MYB (*P1*). O tratamento com APO, no entanto, não apresentou indução dos transcritos. Nossos experimentos demonstraram que a síntese de glutathiona é modulada por NO exógeno em folhas de milho.

Agradecimentos

O presente trabalho foi financiado por FINEP/MCT GENOPROT 2007. CSM foi bolsista da CAPES, Ministério da Educação, Brasil.

CAPÍTULO 3

CLONAGEM DE FRAGMENTO DE RNA RIBOSSÔMICO DE UM FATOR DE TRANSCRIÇÃO R2R3-MYB DE *Araucaria angustifolia*

Carla Souza Mello^a; Paulo Sérgio Schögl^b; Miguel Pedro Guerra^b; Ana Carolina Maisonnave Arisi^a.

^a Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil.

^b Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil.

Resumo

Fatores de transcrição da família MYB têm sido descritos como reguladores da expressão de genes, tanto em animais como em plantas, sendo encontrados em diferentes espécies vegetais. Eles estão envolvidos na rota metabólica de síntese de flavonóides, como as antocianinas, e têm envolvimento direto no sistema de defesa de plantas ao ataque de patógenos ou outras condições de estresse. O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa de nitrogênio envolvida na atividade transcripcional de um amplo grupo de genes. A família de genes de fatores de transcrição R2R3-MYB de *Arabidopsis thaliana* desperta grande interesse para o estudo de regulação por nitrosilação por apresentar uma cisteína passível de ser nitrosilada. A fim de contribuir com o conhecimento do mecanismo molecular de ação do NO, o objetivo deste trabalho foi clonar um cDNA que codificasse um fator de transcrição R2R3-MYB em *Araucaria angustifolia*. Para isso, o RNA total de culturas celulares, embriões zigóticos e plântulas de *A. angustifolia* foi extraído e sintetizado um cDNA para inserção em vetores de clonagem e seqüenciamento. Utilizaram-se iniciadores degenerados desenhados a partir de regiões altamente conservadas de fatores de transcrição MYB de diferentes espécies vegetais. Dos cultivos de plantas que puderam ser clonados e seqüenciados, verificou-se alta homologia dos fragmentos amplificados com RNA ribossomal de várias espécies de coníferas, grupo em que se encontra o gênero *Araucaria*.

Palavras-chave: Óxido nítrico, *Araucaria angustifolia*, fator de transcrição MYB, clonagem, iniciadores degenerados.

Introdução

A. angustifolia é uma conífera nativa com significativa importância econômica no Brasil. Essa espécie é fonte de sementes, madeira, fibra e resina (SILVEIRA et al., 2002). A intensa exploração da araucária, cuja madeira é de grande importância comercial, tem levado essa espécie à ameaça de extinção. Estudos que visam a sua preservação têm sido realizados, e tratam desde aspectos ambientais, como solo e clima, até alternativas biotecnológicas para manutenção e propagação da espécie (GUERRA et al., 2002).

Diversos processos celulares em espécies vegetais são controlados por fatores de transcrição MYB, como a resistência de plantas a doenças (VAILLEAU et al., 2002), divisão celular (HIRAYAMA; SHINOZAKI, 1996) e metabolismo de compostos secundários, como os flavonóides (BOREVITZ et al., 2000; COMINELLI et al., 2008). A subfamília de fatores de transcrição MYB com duas repetições (R2R3-MYB) está diretamente envolvida na síntese de flavonóides (STRACKE; WERBER; WEISSHAAR, 2001; STRACKE et al., 2007; LEPINIEC et al., 2006). Diversos mecanismos regulatórios indiretos como formação de peroxinitrito, reação com metais de transição e S-nitrosilação tem sido propostos como mediadores da ação do NO na atividade transcripcional (POLVERARI et al., 2003; SERPA et al., 2007). Foi comprovado que o NO modifica a atividade de ligação ao DNA de MYB2 de *A. thaliana*, demonstrando a regulação de um fator de transcrição de plantas por S-nitrosilação (SERPA et al., 2007).

Alguns fitorreguladores podem influenciar na liberação de NO, como ácido abscísico (ABA) ou putrescina (PUT). Foi observado que o tratamento de células embrionárias de araucária com PUT levou ao aumento da liberação de NO e foi proposto que a síntese de NO esteja relacionada à manutenção da polaridade do embrião somático de araucária (SILVEIRA et al., 2006).

O objetivo desse trabalho foi clonar cDNAs que possivelmente codifiquem fatores de transcrição R2R3-MYB de *A. angustifolia* que contenham uma cisteína passível de ser nitrosilada a fim de contribuir para o conhecimento do mecanismo molecular de ação do NO.

Material e métodos

Material vegetal: Cultivo celular e plântulas de *A. angustifolia*

As coletas de material vegetal para extração de RNA foram realizadas a partir de três estágios de desenvolvimento de *A. angustifolia*: fase pró-embrionária, embrião zigótico e plântula (espículas e raízes).

A indução da cultura embriogênica de *A. angustifolia* foi realizada a partir de sementes coletadas entre dezembro de 2007 e janeiro de 2008 em São Joaquim, no planalto serrano de Santa Catarina, realizada no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV – CCA, UFSC). Embriões pré-cotiledonares foram inoculados em placas de Petri contendo 20 mL de meio BM (Grupta & Pullman, 1991) suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ piridoxina.HCL, 0,5 mg.L⁻¹ ácido nicotínico, 1 mg.L⁻¹ tiamina.HCL, 2 mg.L⁻¹ glicina, 500 mg.L⁻¹ caseína hidrolisada, 1 g.L⁻¹ myo-inositol, 1 g.L⁻¹ L-glutamina, 30 g.L⁻¹ sacarose e 2 g.L⁻¹ Phytigel (Sigma) de acordo com especificações de STEINER et al. (2005). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de Phytigel. O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 min. Solução de vitaminas foi adicionada por filtro-esterilização ao meio após esterilização. A indução das culturas embriogênicas foi feita em placas com meio BM em dois tratamentos: S₀ (meio livre de reguladores de crescimento) e S₂ (meio suplementado com 5 µM 2,4-ácido diclorofenoacético (2,4-D), 2 µM benzilaminopurina (BAP) e 2 µM cinetina (Kin)). As culturas foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura controlada de 25 °C ± 1 °C no escuro. Para manutenção, as culturas celulares que apresentavam aspecto translúcido a branco eram transferidas a cada 20 dias para novo meio e mantidas sob as mesmas condições. Para a maturação dos embriões somáticos, o meio de cultura BM foi suplementado com 150 µM ABA.

Embriões zigóticos de araucária foram coletados a partir de sementes de pinhão adquiridas em abril de 2009 em São Joaquim, SC. Os tegumentos externos das sementes foram removidos deixando o endosperma intacto. Os endospermas foram esterilizados com etanol 70% por 2 min, seguido por imersão em hipoclorito de sódio 40% por 20 min em cabine de fluxo laminar. Após três lavagens com água

destilada autoclavada, os embriões foram cuidadosamente removidos e armazenados a -20°C para posterior extração de RNA ou imediatamente inoculados em frascos contendo meios de crescimento sem hormônios (S_0), adicionados de ABA ou PUT para a obtenção de plântulas.

As plântulas que conseguiram se desenvolver a partir dos embriões inoculados em meio S_0 , ABA ou PUT com idade de 2 meses foram coletadas para remoção de espículas e parte radicular e armazenadas em freezer para extração de RNA. Além disso, foram analisadas as partes aéreas e radiculares de plântulas de araucária com idade de sete meses, coletadas a partir da germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de *A. angustifolia*, e cultivados em formulação salina BM suplementada com sacarose (30 g.L^{-1}), gentilmente cedidos pelo LFDGV.

Para as induções de culturas embriogênicas foram feitas três placas contendo cinco colônias em cada e as análises foram realizadas a partir de um pool das colônias de cada placa. Os embriões zigóticos tiveram o RNA extraído em triplicata e as plântulas foram coletadas e analisadas também em triplicata.

Desenho dos iniciadores

Para o experimento de clonagem do gene que codifica um fator de transcrição R2R3-MYB foi feita a busca por genes ortólogos no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) a partir da seqüência dos clones de *Arabidopsis*, codificados como U63651 (*AtMYB2*), U11654 (*AtMYB4*) e U16062 (*AtMYB30*). Os clones contendo plasmídeos de *AtMYB2*, *AtMYB4* e *AtMYB30* foram gentilmente fornecidos pelo Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina, e seus números de acesso obtidos do banco de dados de *A. thaliana* (<http://www.arabidopsis.org>). Genes ortólogos correspondentes foram acessados no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), de onde se obteve a seqüência de aminoácidos que compõem a proteína correspondente. Essa seqüência foi analisada no programa BLAST-N (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível no banco de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), ordenando-as por similaridade. Os nucleotídeos utilizados neste experimento constam na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Iniciadores degenerados (exceto VitVF/VitVR) desenhados para amplificação de regiões no gene de *A. angustifolia* correspondentes aos fatores de transcrição MYB de *A. thaliana* e *V. vinifera*.

Iniciador	Seqüência de nucleotídeos	Tamanho do fragmento
M2 F	AGCKCCRTGGACBGHDGADGARGA	374 nt
M2 R	CKKGGSATCCAVASRTWDCKCAT	
M4 F	AACAARGGHGCVTGGACBAARGARGA	280 nt
M4 R	TTYTTDATCTCRTRTCHGTYCKYCC	
M30 F	AAARKNGGWRTSAAGAAAGG	470 nt
M30 R	TKYTTVGCCAWRTKRATATC	
Vit1 F	TGYGGNAARTCNTGKRGRCTNRGRTGG	175 nt
Vit2 R	RTTYTTNACKTCRTRTTCNGTNCGNCCNGGNAG	
Vit3 F	TGYTCNAARTCNTGKRGRCTNRRGRTGG	175 nt
Vit4 R	RTTYTTRATKTCRTRTTCNGTNCGNCCNGGNAG	
VitV F	TACATTCGAAAAAACGGCGAAGG	190 nt
VitV R	AGACCGCCTGGAAGGACAGACAA	

Síglas: nt, nucleotídeos; A, C, G e T correspondem aos nucleotídeos adenina, citosina, guanina e tiamicina, respectivamente. As outras letras representam as seguintes combinações de nucleotídeos: K = T+G; R = A+G; B = T+C+G; H = A+T+C; D = A+T+G; S = C+G; W = A+T; Y = C+T; V = A+C+G; N = A+C+G+T.

Extração de RNA

Para a extração do RNA dos cultivos de araucária foi utilizado o kit RNAqueous Miniprep (Ambion, Applied Biosystems) segundo orientações do fabricante. A concentração de RNA foi determinada utilizando o NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies) para medida da absorvância de cada amostra em comprimento de onda de 260 nm. Para isso, diluiu-se uma alíquota de amostra de RNA em TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) e a densidade ótica

(D.O.) foi lida. Uma medida da efetiva pureza do RNA é a razão entre a D.O. a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) que deve estar entre 1,8 e 2,1, além da visualização em gel de agarose para verificação do arraste típico do RNA total.

Transcrição reversa e PCR

Alíquotas de 2 ng de RNA total extraído foram utilizadas na transcrição reversa para a síntese dos cDNAs utilizando-se AccessQuick™ RT-PCR System (Promega) conforme instruções do fabricante.

As amplificações foram realizadas em termociclador Minicycler™ (MJ Research, Inc. Watertown, MA, EUA), em um volume final de 25 ou 50 µL. As condições de PCR foram adaptadas para cada par de iniciadores, sendo que todas as reações iniciaram com uma etapa de transcrição reversa a 45°C por 45 min seguida imediatamente pela PCR. As condições de temperatura das PCRs foram: para os iniciadores M2F/M2R, Vit1F/Vit2R e Vit3F/Vit4R – desnaturação a 95°C por 2 min seguida por 40 ciclos de 95°C por 1 min, 58°C por 1 min, 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min; M4F/M4R e VitVF/VitVR – desnaturação a 95°C por 2 min seguida por 40 ciclos de 95°C por 1 min, 53°C por 1 min, 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min; M30F/M30R – desnaturação a 95°C por 2 min seguida por 40 ciclos de 95°C por 1 min, 45°C por 1 min, 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min.

Os produtos das PCRs foram analisados através de migração em gel de agarose 2,5 % corado com brometo de etídio submetido a uma diferença de potencial de 80 V, a 400 mA por 50 min. Os fragmentos que apresentaram o tamanho esperado foram então purificados para nova PCR.

Purificação dos produtos da PCR

A purificação do DNA a partir do gel de agarose foi feita utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), conforme orientações do

fabricante. Para isso, os fragmentos foram cuidadosamente removidos do gel com o auxílio de um bisturi e imediatamente purificados. Com o fragmento obtido da purificação foi realizada uma segunda amplificação sob as mesmas condições específicas para cada par de iniciadores.

Clonagem e seqüenciamento

A inserção do fragmento da segunda PCR no vetor de clonagem pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega) foi realizada conforme as indicações do fabricante. Os vetores contendo o inserto foram mantidos a -20°C até a transformação. Uma alíquota de 2 a 4 µL do plasmídeo foi utilizada para a transformação de bactérias competentes *E. coli* DH5-α e os inóculos estriados e incubados em meio sólido Lúria Bertani (LB) com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina. Oito ou nove colônias foram retiradas de cada placa e incubadas em meio LB líquido. Para certificação de que os vetores continham o inserto do tamanho esperado, foi feita migração em gel de agarose. Após a transformação das bactérias, os plasmídeos foram purificados com o PureYield[™] Plasmid Miniprep System (Promega) ou Wizard Plasmid Miniprep (Promega) conforme orientações do fabricante e quantificados em espectrofotômetro com absorvância a 260 nm. Foi mantida uma relação A_{260}/A_{280} entre 1,9 e 2,6, indicando boa qualidade/pureza do material. Alíquotas de 300 ng dos plasmídeos e 5 pmol dos iniciadores universais pUC/M13 (Promega) foram enviadas para seqüenciamento. O seqüenciamento das amostras foi realizado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, sob a supervisão do Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza.

Resultados e discussão

Na tentativa de clonagem do gene que codifica um fator de transcrição R2R3-MYB foi feita a busca por genes ortólogos no banco de dados do NCBI a fim de desenhar iniciadores degenerados. As diferentes seqüências de nucleotídeos (nt)

que apresentaram as maiores similaridades a partir de genes de pelo menos 5 espécies obtidas no NCBI, foram analisadas no programa Clustal X2, para o alinhamento biologicamente significativo entre elas. Regiões que apresentaram maior conservação de nt foram escolhidas para desenho dos iniciadores degenerados (M2F/M2R, M4F/M4R e M30F/M30R; Figura 3.1). A degeneração foi feita nas posições onde os nt não se apresentavam conservados, sendo feita uma substituição do conjunto de nt por uma base degenerada equivalente. Foram também sintetizados mais três pares de iniciadores sugeridos pelo grupo de pesquisa do Prof. Raul Cassia, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina (Vit1F/Vit2R, Vit3F/Vit3R, VitVF/VitVR) a partir de regiões conservadas de MYB de *V. vinifera*.

O desenho de iniciadores degenerados para amplificação das regiões-alvo foi desenvolvido com o objetivo de se encontrar um gene MYB com sítio de nitrosilação na araucária. Os iniciadores sintetizados correspondem às regiões de MYB2, MYB4 e MYB30 de *A. thaliana*, e neste trabalho foram denominados M2F/M2R, M4F/M4R e M30F/M30R, respectivamente (Tabela 3.1). Os iniciadores sintetizados a partir de *V. vinifera* correspondem a regiões que codificam fatores de transcrição MYB dessa espécie e foram denominados Vit1F/Vit2R, Vit3F/Vit4R e VitVF/VitVR.

A

M2F

Gossypium hirsutum D-genome myb-like transcription factor Myb 5 gene
 Gossypium hirsutum myb-like transcription factor 5 (MYB5) gene
 Gossypioides kirkii myb-like transcription factor 5 (MYB5) gene
 A. gemmifera gene for MYB transcription factor Atmyb2, partial CDs
 Vitis vinifera contig VV78X243387.4, whole genome shotgun sequence
 O. sativa Japonica Group genomic DNA, chromosome 7, BAC clone:OJ1165_F02

```

AGAGATGGAGCTAAGGAAGGCTCCATGGACGAAAGAGAGGACTCCATGC 100
AGAGATGGAGCTAAGGAAGGCTCCATGGACGAAAGAGAGGACTCCATGC 100
AGAGATGGAGCTAAGGAAGGCTCCATGGACGAAAGAGAGGACTCCATGC 100
AGATTCTGATGTACGGAAAGGCTCCATGGACGAAAGAGAGGACTCCATGC 94
GAACATGGACCTGAGGAAAGGCTCCATGGACGAAAGAGAGGACTCCATGC 52
CGGCGACGAGCTCCGGCGAGGCTCCATGGACGAAAGAGAGGACTCCATGC 88
  
```

* * * * *
 AGGKCCRTGGACBGHDGADGARGA

M2R

Gossypium hirsutum D-genome myb-like transcription factor Myb 5 gene
 Gossypium hirsutum myb-like transcription factor 5 (MYB5) gene
 Gossypioides kirkii myb-like transcription factor 5 (MYB5) gene
 A. gemmifera gene for MYB transcription factor Atmyb2, partial CDs
 Vitis vinifera contig VV78X243387.4, whole genome shotgun sequence
 O. sativa Japonica Group genomic DNA, chromosome 7, BAC clone:OJ1165_F02

```

GCAACAATTCAAGGACGCCATGGCTTACGTTTGGATCCCCCTTACT 450
GCAACAATTCAAGGACGCCATGGCTTACGTTTGGATCCCCCTTACT 450
GCAACAATTCAAGGACGCCATGGCTTACGTTTGGATCCCCCTTACT 450
GTAATCTTTTCAAGGACACATGCAAAATGTTGGATCCCAAGATGCTG 444
GCAAGCAATTCAGAGACACCATGGCTTACGTTTGGATCCCAAGATGCTG 402
CCAGCAGTTCAAGGACCTCATGGCTTACGTTTGGATCCCCCTTACT 438
  
```

* * * * *
 TACKCDWTRSVAACCTASGGKKC

B

M4F

A. thaliana putative tr. factor MYB4 (At4g38620) mRNA
 Gossypium hirsutum GHMYB9 (ghmyb9) mRNA
 L. esculentum mRNA, myb-related gene
 E. gunnii mRNA for MYB transcription factor (myb1 gene)
 T. fluminensis MYB6 (myb6)mRNA
 P. glauca R2R3-MYB tr.factor MYB5 mRNA

```

GTGAGAAAGCTCACACAACAAAAGGAGCTGGACGAAAGAGAGGAG 100
GTGAGAAAGCTCACACAACAAAAGGAGCTGGACGAAAGAGAGGAGT 69
GTGAGAAAGCTCACACAACAAAAGGAGCTGGACGAAAGAGAGGAGT 69
GTGAGAAAGCTCACACAACAAAAGGAGCTGGACGAAAGAGAGGAGT 69
GTGAGAAAGCTCACACAACAAAAGGAGCTGGACGAAAGAGAGGAGT 69
GTGAGAAAGCTCACACAACAAAAGGAGCTGGACGAAAGAGAGGAGT 69
  
```

* * * * *
 AACAAAGGGHCVTGGACBAARGARGA

M4R

A. thaliana putative tr. factor MYB4 (At4g38620) mRNA
 Gossypium hirsutum GHMYB9 (ghmyb9) mRNA
 L. esculentum mRNA, myb-related gene
 E. gunnii mRNA for MYB transcription factor (myb1 gene)
 T. fluminensis MYB6 (myb6)mRNA
 P. glauca R2R3-MYB tr.factor MYB5 mRNA

```

GCTTATTGCGGGAGATTACCGGAAAGACGAAAGAGAGATGAAACT 350
TCTTATAGCGGGAGATTACCGGAAAGACGAAAGAGATGAAACT 319
GCTTATTGCGGGAGATTACCGGAAAGACGAAAGAGATGAAACT 319
GCTCATTGCTGGGGGTTTGGCAGGAGACGAAAGAGATGAAACT 319
TCTAATGCGGGAGATTACCGGAAAGACGAAAGAGATGAAACT 319
TCTTATTGCGGGAGATTACCGGAAAGACGAAAGAGATGAAACT 319
  
```

* * * * *
 CCYKCYGHCTRTRCTCTADTYTT

C

M30F

Vitis vinifera chromosome chr14 scaffold_21
 L.esculentum mRNA for myb-related transcription factor, THM6
 Citrus macrophylla MYB60-like protein gene
 Glycine max MYB transcription factor MYB187 (MYB187) mRNA
 Gossypium hirsutum myb transcription factor MYB30 mRNA
 Arabidopsis thaliana MYB family transcription factor (At3g28910) mRNA

```

ATGGGAAGACCACCTTGCTGTGATAAATCGGCTCGAAGAAAGGACCATG 50
ATGGGTAGAGTCCCTTGTGTGATAAATCGGCTCGAAGAAAGGACCATG 50
ATGGGAAGGCCACCTTGTGTGATAAATCGGCTCGAAGAAAGGACCATG 50
ATGGGAAGGCCACCTTGTGTGATAAATCGGCTCGAAGAAAGGACCATG 47
ATGGGAAGACACCTTGTGTGATAAATCGGCTCGAAGAAAGGACCATG 50
ATGGTGAGGCTCCTTGTGTGATAAATCGGCTCGAAGAAAGGACCATG 50
  
```

* * * * *
 AAARKNGWRTSAAGAAAGG

M30R

Vitis vinifera chromosome chr14 scaffold_21
 L.esculentum mRNA for myb-related transcription factor, THM6
 Citrus macrophylla MYB60-like protein gene
 Glycine max MYB transcription factor MYB187 (MYB187) mRNA
 Gossypium hirsutum myb transcription factor MYB30 mRNA
 Arabidopsis thaliana MYB family transcription factor (At3g28910) mRNA

```

GCCAGTGGGAGAGAAGGCTTCAACCTGATATCCATATGGCAAAAGGACT 474
GACAATGGGAAAGGACACTTCAAGCTGATATTAACATGGCAAAAGGACT 492
GTCAGTGGGAGAGAAGGCTTCAAGCTGATATTAACATGGCAAAAGGACT 492
GCCAGTGGGAGAGAAGGCTTCAACCTGATATTAACATGGCAAAAGGACT 492
GTCAGTGGGAGAGAAGGCTTCAAGCTGATATTAACATGGCAAAAGGACT 474
GCCAATGGGAAAGGCGACTTCAACCTGATATTAACATGGCAAAAGGACT 498
  
```

* * * * *
 CTATARKTRWACGGVTTYKT

Figura 3.1: Alinhamento para o desenho de iniciadores degenerados de A) MYB2, B) MYB4, C) MYB30

O RNA total de *A. angustifolia* foi extraído em diferentes condições de cultivo celular, de plântulas e de embriões zigóticos. O cDNA obtido do RNA total foi utilizado como molde para as reações de PCR com iniciadores degenerados ou não e clonado em vetores pGEM T-Easy a partir de cultivo pró-embriônico que codifica possíveis fatores de transcrição R2R3-MYB de araucária. As extrações de RNA total e posteriores ampliações de *A. angustifolia* foram realizadas somente nos cultivos

que se desenvolveram. Os cultivos embriogênicos crescidos em S_0 e S_2 , embriões zigóticos, plântulas com idade de dois meses inoculadas em S_0 e PUT e plântulas com sete meses crescidas em meio BM apresentaram desenvolvimento esperado e puderam ser usados para extração de RNA. Os embriões inoculados em meio contendo ABA não desenvolveram e, por isso, não foram usados nas análises.

As amostras que apresentaram extrações de RNA bem sucedidas de cultivos celulares, embriões zigóticos e plântulas foram submetidas à síntese de cDNA. Os critérios de avaliação foram uma boa visualização do arraste do RNA em gel de agarose não-desnaturante 1,5% e relação A_{260}/A_{280} em torno de 2,0. Dos cultivos que tiveram o RNA extraído, a metodologia foi eficaz para os embriões zigóticos e para as espículas de plântulas sem tratamento (S_0) e as espículas de plântulas tratadas com PUT. Para as raízes das plântulas o método de extração não foi eficaz.

Os RNAs de boa qualidade foram então submetidos à transcrição reversa para síntese de cDNA e posterior PCR com todos os iniciadores sintetizados (Tabela 3.1). Os fragmentos que amplificaram e apresentaram boa visualização no gel de agarose foram então extraídos do gel, purificados e novamente amplificados para se conseguir maior número de cópias do fragmento obtido. Os cDNAs sintetizados com os iniciadores M30 não apresentaram boa visualização no gel (dados não mostrados), por isso não foram reamplificados. Os produtos da PCR foram então inseridos no vetor de clonagem e transformados em bactérias competentes. Destes, obteve-se êxito na inserção de produtos de amplificação obtidos a partir de espículas de plântulas cultivadas sem tratamento (S_0) e tratadas com PUT, amplificados com iniciadores M2F/M2R, M4F/M4R, Vit1F/Vit2R, Vit3F/Vit4R, e VitVF/VitVR. Para o seqüenciamento foram aliqüotados 300 ng de DNA plasmidial e 5 pmol dos iniciadores universais pUC/M13 (Promega) e enviados para análise.

Seqüenciamentos bem sucedidos são caracterizados por picos bem definidos nos gráficos de resultados. Os fragmentos amplificados pelos iniciadores M2F/M2R, Vit1F/Vit2R, Vit3F/Vit4R, e VitVF/VitVR não apresentaram boa definição nos dados dos seqüenciamentos. Os resultados obtidos com os seqüenciamentos apresentaram maior precisão apenas para fragmentos amplificados com iniciadores M4F/M4R em plântulas cultivadas sem tratamento (S_0) (Figura 3.2) e tratadas com PUT (Figura 3.3).

```

          110          120          130          140          150
M4S0F_for      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
M4S0_rev_compl -----CG-TGGGAGCTCTCCCAT 17
Clustal Consensus          ** *****

          160          170          180          190          200
M4S0F_for      ATGGTCGAGCTGCAGGCGGGCGGAATTCAGTAGTGATTAACAAGGGCGC 67
M4S0_rev_compl ATGGTCGACNTGCAGGCGNCCGCGAATTCANTAGTGATTAACAAGGGCGC 200
Clustal Consensus ***** *****

          210          220          230          240          250
M4S0F_for      CTGGACGAAGGAGGACGCGGGGGTCGTCGAGAAGCCTCGGGCGCGAGCCC 117
M4S0_rev_compl CTGGACGAAGGAGGACGCGGGGGTCGTCGAGAAGCCTCGGGCGCGAGCCC 250
Clustal Consensus *****

          260          270          280          290          300
M4S0F_for      GGGCGGACCGGCCCTCGGTGCAGATCTTGGTGGTAGTAGCAAATATTCAA 167
M4S0_rev_compl GGGCGGACCGGCCCTCGGTGCAGATCTTGGTGGTAGTAGCAAATATTCAA 300
Clustal Consensus *****

          310          320          330          340          350
M4S0F_for      ATGAGAACTTTGAAGACTGAAGTGGGAAAGGTTCCATGTGAACAGCACT 217
M4S0_rev_compl ATGAGAACTTTGAAGACTGAAGTGGGAAAGGTTCCATGTGAACAGCACT 350
Clustal Consensus *****

          360          370          380          390          400
M4S0F_for      TGGACATGGGTTAGTCGATCCTAAGAGATGGGGAAGCCCTGTTTCAAGGG 267
M4S0_rev_compl TGGACATGGGTTAGTCGATCCTAAGAGATGGG-AAGCCCTGTTTCAAGGG 399
Clustal Consensus *****

          410          420          430          440          450
M4S0F_for      CGCACTCCGCGCGAGCATCGAAAGGGAATCGGGTTAATATTCGCCGACCG 317
M4S0_rev_compl CGCACTCCGCGCGAGCATCGANAGGGAATCGGGTTAATATTCGCCGACCG 449
Clustal Consensus *****

          460          470          480          490          500
M4S0F_for      GGACGTANGGCGGACTGACAACGAGATTAAGAAAATCGAATT-CCGCGGC 366
M4S0_rev_compl GGACGTAGGGCGGACTGACAACGAGATTAAGAAAATCGAATTCCCGCGNC 499
Clustal Consensus *****

          510          520          530          540          550
M4S0F_for      CGCCATGGCGGNCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGT 416
M4S0_rev_compl CGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGG----- 530
Clustal Consensus *****

```

Figura 3.2: Seqüência obtida com fragmentos amplificados com iniciadores M4F/M4R a partir de espículas de plântulas crescidas em meio S_0 .

```

          110      120      130      140      150
M4PUT_for      -----GCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTC 34
M4PUT_rev_compl AGAATACTCAAGCTATGCATCCGACGCGNTGGGAGCTCTCCCATATGGTC 150
Clustal Consensus *****

          160      170      180      190      200
M4PUT_for      GACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACCTAGTGATT-AACAAGGGCGCGTGGA 83
M4PUT_rev_compl GACNTGCAGGCGGCCGCGAATTCANNAGTGATTAACAAGGGCGCGTGGA 200
Clustal Consensus *** *****

          210      220      230      240      250
M4PUT_for      CGAAGGAGGACCCTATGAAGCTTTACTGTTCCCTGGGATTGGCTTTGGGC 133
M4PUT_rev_compl CGAAGGAGGACCCTATGAAGCTTTACTGTTCCCTGGGATGGGCTTTGGGC 250
Clustal Consensus *****

          260      270      280      290      300
M4PUT_for      TCTTCTTGCGCAGCTTAGGTGGAAGGCGAAGAAGGCCCCCTCCGGGGGG 183
M4PUT_rev_compl TCTTCTTGCGCAGCTTAGGTG-AAGGCGAAGAAGGCCCCCTCCGGGGGG 299
Clustal Consensus *****

          310      320      330      340      350
M4PUT_for      GTCTGAGCCATCAGTGAGATACCACTCTAGAAGAGCCTGAATCCTAACCT 233
M4PUT_rev_compl -TNTGAGCCATCAGTGAGATACCACTGTAGAAGAGCCTGAATCCTAACCT 348
Clustal Consensus * *****

          360      370      380      390      400
M4PUT_for      TGCGTCAAGACTACAGGCCAAGGGACAGTCTCAGGTAGACAGTTTCTATG 283
M4PUT_rev_compl TGCGTCAAGACTACAGGCCAAGGGACANTCTCAGGTAGACAGTTTCTATG 398
Clustal Consensus *****

          410      420      430      440      450
M4PUT_for      GGGCGTAG-CCTCCCAAAGGTAACGGAGGCGTGCAAAGGTTT-CTCGGG 331
M4PUT_rev_compl GGGCGTAGGCTCCCAAAGCCCGGAGGCGTGCAAAGGTTTCTCGGG 448
Clustal Consensus *****

          460      470      480      490      500
M4PUT_for      CGGACAGACAATGAGATCNAGAAAATCGAATTCCTCGGGCGG-CATGGCG 380
M4PUT_rev_compl CGGACAGACAATGAGATCAAGAAAATCGAATTCCTCGGCCCGCCATGACG 498
Clustal Consensus *****

          510      520      530      540      550
M4PUT_for      GNCGGGAGCATGCGANGTCGGGCCCAATTCCTTATAGTGAGTCGTNTTA 430
M4PUT_rev_compl GCCGGGAGCA----- 508
Clustal Consensus * *****

```

Figura 3.3: Seqüência obtida com fragmentos amplificados com iniciadores M4F/M4R a partir de espículas de plântulas tratadas com PUT.

Na seqüência obtida para espículas de plântulas crescidas em meio S_0 verificou-se alta homologia com RNA ribossomal de diferentes espécies de coníferas da família *Araucariaceae*, como *Wollemia nobilis*, originária da Austrália, *Agathis robusta* e *A. alba* e diversas outras espécies do gênero *Araucaria*. Esses dados confirmam que o fragmento amplificado de *A. angustifolia* com os iniciadores degenerados é pertencente a uma região altamente conservada dentro desta família

de coníferas. O fragmento seqüenciado a partir do tratamento com PUT apresentou homologia com RNA ribossomal com o genoma parcial de diversas coníferas do gênero *Pinus* (Tabela 3.3), próxima filogeneticamente de araucária. Nenhuma homologia significativa com fatores de transcrição MYB disponíveis nos bancos de dados *on line* foi verificada, somente foi possível a confirmação de similaridade com RNA ribossômico de araucária. A caracterização dos cDNAs foi feita com auxílio do programa BLAST-N para verificação de homologia com seqüências previamente descritas.

Os resultados obtidos neste trabalho são pouco elucidativos em relação à presença de fatores de transcrição MYB em araucária. Por ser uma espécie ainda muito pouco estudada não foi possível o desenho de iniciadores específicos para esse fim. A pouca especificidade das amplificações e a baixa similaridade entre as seqüências obtidas provavelmente se deve a divergência das seqüências da Araucária em relação às espécies utilizadas para o desenho dos oligonucleotídeos ou por que os estágios biológicos em que foram feitas as coletas de *A. angustifolia* não tenham sido os mais adequados para investigação dos fatores de transcrição MYB. Pesquisas aprofundadas são necessárias para que se adquiram informações mais precisas a nível molecular dessa importante espécie em extinção.

Tabela 3.2: Similaridade (Blast N) da seqüência de espículas de plântulas crescidas em meio S₀ amplificadas com iniciadores M4F/M4R

Número de Acesso	Descrição	Escore máximo	Escore total	Cobertura da seqüência	E-value	Identidade máxima
EU165007.1	Wollemia nobilis 26S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	464	464	90%	1e-127	98%
EU165006.1	Araucaria heterophylla 26S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	464	464	90%	1e-127	98%
EU165004.1	Araucaria brasiliensis 26S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	464	464	90%	1e-127	98%
EU165003.1	Araucaria bidwillii 26S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	464	464	90%	1e-127	98%
EU165002.1	Agathis robusta 26S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	464	464	90%	1e-127	98%
EU165000.1	Agathis alba 26S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	464	464	90%	1e-127	98%
FJ179544.1	Araucaria araucana 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	459	459	90%	5e-126	97%
EU165005.1	Araucaria cunninghamii 26S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	453	453	90%	2e-124	97%
EU165001.1	Agathis dammara 26S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	453	453	90%	2e-124	97%
EU161318.1	Sciadopitys verticillata 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	431	431	90%	1e-117	95%
EU161360.1	Dacrycarpus imbricatus 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	414	414	90%	1e-112	94%
EU161314.1	Saxegothaea conspicua 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	414	414	90%	1e-112	94%
EU161359.1	Keteleeria davidiana var. calcarea 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	409	409	90%	5e-111	94%
EU161343.1	Taiwania cryptomerioides 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	409	409	90%	5e-111	94%
EU161339.1	Phyllocladus trichomanoides 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	409	409	90%	5e-111	94%
EU161336.1	Lepidothamnus laxifolius 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	409	409	90%	5e-111	94%
EU161335.1	Lagarostrobos franklinii 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	409	409	90%	5e-111	94%
EU161329.1	Microcachrys tetragona 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	409	409	90%	5e-111	94%

Tabela 3.3: Similaridade (Blast N) da seqüência de espículas de plântulas tratadas com PUT amplificadas com iniciadores M4F/M4R.

Número de acesso	Descrição	Escore máximo	Escore total	Cobertura da seqüência	E-value	Identidade máxima
DQ629324.1	<i>Araucaria araucana</i> large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	442	442	85%	5e-121	98%
DQ629233.1	<i>Sphagnum capillifolium</i> large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	385	385	86%	8e-104	94%
DQ629232.1	<i>Sphagnum palustre</i> large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	385	385	86%	8e-104	94%
AF393612.1	<i>Sphagnum rubellum</i> large subunit ribosomal RNA (rrl) gene, complete sequence; chloroplast gene for chloroplast product	385	385	86%	8e-104	94%
AP009339.1	<i>Cycas taitungensis</i> chloroplast DNA, complete genome	379	759	86%	4e-102	93%
DQ629322.1	<i>Zamia integrifolia</i> large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	379	379	86%	4e-102	93%
DQ629320.1	<i>Cycas revoluta</i> large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	379	379	86%	4e-102	93%
FJ546412.1	<i>Syntrichia ruralis</i> chloroplast, complete genome	375	751	86%	5e-101	93%
DQ821119.1	<i>Angiopteris evecta</i> chloroplast, complete genome	375	751	86%	5e-101	93%
DQ629247.1	<i>Hymenostylium recurvirostre</i> large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	375	375	86%	5e-101	93%
FJ899564.2	<i>Pinus torreyana</i> subsp. <i>torreyana</i> chloroplast, partial genome	374	374	86%	2e-100	93%
FJ899563.2	<i>Pinus torreyana</i> subsp. <i>insularis</i> chloroplast, partial genome	374	374	86%	2e-100	93%
FJ899583.1	<i>Pinus pinaster</i> chloroplast, partial genome	374	374	86%	2e-100	93%
FJ899581.1	<i>Pinus parviflora</i> var. <i>pentaphylla</i> chloroplast, partial genome	374	374	86%	2e-100	93%
FJ899579.1	<i>Pinus merkusii</i> chloroplast, partial genome	374	374	86%	2e-100	93%
FJ899577.1	<i>Pinus lambertiana</i> chloroplast, partial genome	374	374	86%	2e-100	93%
FJ899576.1	<i>Pinus flexilis</i> chloroplast, partial genome	374	374	86%	2e-100	93%
FJ899575.1	<i>Pinus leiophylla</i> var. <i>chihuahuana</i> chloroplast, partial genome	374	374	86%	2e-100	93%

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente trabalho contribuem para elucidar a influência de SNP, um doador de NO, e de apocinina, um indutor de NO, na expressão gênica do gene de actina (*act*), de genes envolvidos na síntese de glutationa (γ -*ecs* e *gsh-s*) e de fenilpropanóides (*chs*, *pal.1* e *P1*). Folhas de milho foram tratadas com apocinina e com SNP, e os transcritos 12 h após o tratamento foram quantificados por PCR em tempo real. Foi demonstrado que SNP é capaz de induzir significativamente a expressão de genes responsáveis pela síntese de enzimas da rota biossintética de glutationa (γ -*ecs* e *gsh-s*) e também do gene envolvido na expressão de um fator de transcrição MYB (*P1*). O tratamento com APO, no entanto, não apresentou indução dos transcritos. Nossos experimentos demonstraram que a síntese de glutationa é modulada por NO exógeno em folhas de milho.

A busca por possíveis fatores de transcrição MYB em cultivos de *A. angustifolia* foi realizada através do uso de iniciadores desenhados a partir de bancos de dados de seqüências. De todos os fragmentos amplificados, somente foi verificada similaridade com RNA ribossomal de outras espécies de *Pinus*.

REFERÊNCIAS

- ABIMILHO. Associação Brasileira das Indústrias de Milho. Disponível em: < <http://www.abimilho.com.br/ocereal.htm> >. Acesso em: 06.01.10.
- AN, L.; LIU, Y.; ZHANG, M.; CHEN, T.; WANG, X. Effects of nitric oxide on growth of maize seedling leaves in the presence or absence of ultraviolet-B radiation. **Journal of Plant Physiology**. V. 162, p. 317 - 326, 2005.
- AQUINO, F. M. Cultivo da *Araucaria angustifolia*: análise de viabilidade econômico-financeira. Florianópolis: **BRDE**. p. 53, 2005.
- ARASIMOWICZ, A.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. **Plant Science**. V. 172, p. 876 – 887, 2007.
- ARISI, A. C. M.; NOCTOR, G.; FOYER, C. H.; JOUANIN, L. Modification of thiol contents in poplars (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing enzymes involved in glutathione synthesis. **Planta**. V. 203, p. 362 – 372, 1997.
- BALBUENA, T. S.; SILVEIRA, V.; JUNQUEIRA, M.; DIAS, L. L. C.; SANTA-CATARINA, C.; SHEVCHENKO, A.; FLOH, E. I. S. Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). **Journal of Proteomics**. V. 72, p. 337 - 352, 2009.
- BAN, Y.; HONDA, C.; HATSUYAMA Y.; IGARASHI M.; BESSHO H.; MORIGUCHI, T. Isolation and Functional Analysis of a MYB Transcription Factor Gene that is a Key Regulator for the Development of Red Coloration in Apple Skin. **Plant Cell Physiology**. V. 48, n. 7, p. 958 – 970, 2007.
- BELIGNI, M. V.; FATH, A.; BETHKE; P. C.; LAMATTINA, L.; JONES, R. L. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. **Plant Physiology**. V: 129, p. 1642 – 1650, 2002.
- BELIGNI, V.; LAMATTINA, L. Nitric Oxide Protects against Cellular Damage Produced by Methylviologen Herbicides in Potato Plants. **NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 199–208, 1999.

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

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

CRAWFORD, N. M. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. **Journal of Experimental Botany**. V. 57, n. 3, p. 471 – 478, 2006.

D'AMICO, E.; PERROTA, G. Genomics of berry fruits antioxidant components. **Biofactors**. V. 23, p. 179-187, 2005.

DELLEDONNE, M; XIA, Y.; DIXON, R. A.; LAMB, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**. V. 394, p. 585 – 588, 1998.

DANIEL X.; LACOMME, C.; BOREL, J-B.; ROBY, D. A novel myb oncogene homologue in *Arabidopsis thaliana* related to hypersensitive cell death. **The Plant Journal**, v. 20, n. 1, p. 57–66, 1999.

DURNER, J.; WENDEHENNE, D.; KLESSIG, D. F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 95, p. 10328 – 10333, 1998.

EMBRAPA. Sistemas de Produção, 2 Versão Eletrônica - 4ª edição, Set./2008. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/index.htm>>. Acesso em 10.12.09.

FLORYSZAK-WIECZOREK, J.; MILCZAREK, G.; ARASIMOWICZ, M.; CISZEWSKI, A. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? **Planta**. V. 224, p. 1363 – 1372, 2006.

FÖRSTERMANN, U.; SCHIMIDT, H. H. H. W.; POLLOCK, J. S.; SHENG, H.; MITCHELL, J. A.; WARNER, T. D.; NAKANE, M.; MURAD, F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. **Biochemical Pharmacology**. V. 42, p. 1849 – 1857, 1991.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**. V. 17, p. 1866 – 1875, 2005.

GOMEZ, L. D.; VANACKER, H.; BUCHNER, P.; NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Intercellular distribution of glutathione synthesis in maize leaves and its response to short-term chilling. **Plant Physiology**. V. 134, n. 4, p. 1662 – 1671, 2004.

GONZÁLES, A.; ZHAO, M.; LEAVITT, J. M.; LLOYD, A. M. Regulation of anthocyanin biosynthetic pathway by theTTG1/bHLH/MYB transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. **Plant Journal**, v. 53, p. 814-827, 2008.

GRAZIANO, M.; BELLIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. Nitric Oxide Improves Internal Iron Availability in Plants. **Plant Physiology**. V. 130, p. 1852 – 1859, 2002.

GROTEWOLD, E.; CHAMBERLIN, M.; SNOOK, M.; SIAME, B.; BUTLER, L.; SWENSON, J.; MADDOCK, S.; ST. CLAIRE, G.; BOWEN, B. Engineering secondary metabolism in maize cells by ectopic expression of transcription factors. **Plant Cell**. V. 10, p. 721 – 740, 1998.

GROTEWOLD, E.; DRUMMOND, B. J.; BOWEN, 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.

GRÜN, S.; LINDERMAYR, C.; SELL, S.; DURNER, J. Nitric oxide and gene regulation in plants. **Journal of Experimental Botany**. V. 57, n. 3, p. 507 – 516, 2006.

HAO, H.; SUN, J.; CAI, W. Multimodality imaging of nitric oxide and nitric oxide synthases **Free Radical Biology and Medicine**. V. 47, n. 6, p. 684 – 698, 2009.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. V. 55, p. 481 - 504, 2000.

HEINE, G. F.; HERNANDEZ, J. M.; GROTEWOLD, E. Two cysteines in plant R2R3-MYB domains participate in REDOX-dependent DNA binding. **Journal of Biological Chemistry**. V. 279, n. 36, p. 37878 – 37885, 2004.

HEINE, G. F.; MALIK, V.; DIAS, A. P.; GROTEWOLD, E. Expression and molecular characterization of ZmMYB-IF35 and related R2R3-MYB transcription factors. **Molecular Biotechnology**. V. 37, p. 155 – 164, 2007.

HESS, D. T.; MATSUMOTO, A.; KIM, S.; MARSHALL, H. E.; STAMLER, J. S. Protein S-Nitrosilation: purview and parameters. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. V. 6, P. 150 – 166, 2005.

HIRAYAMA, T; SHINOZAKI; K. A cdc51 homolog of a higher plant, *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 93, p. 13371 – 13376, 1996.

HOAGLAND, D. R. and ARNON, D. I. The water–culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experiment Station**. Circular, v. 347, p. 1 – 39, 1950.

HONDA, C. et al. Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin. **Plant Physiology and Biochemistry**. V. 40, p. 955 – 962, 2002.

HSU, Y. T. and KAO, C. H. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **Plant Growth Regulation**. V. 42, p. 227 – 238, 2004.

HUANG, X.; STETTMAIER, K.; MICHEL, C.; HUTZLER, P.; MUELLER, M. J.; DURNER, J. Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**. V. 218, p. 938 – 946, 2004.

HUANG, X.; RAD, U. von; DURNER, J. Nitric oxide induces the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. **Planta**. V. 215, p. 914 – 923, 2002.

INNOCENTI, G.; PUCCIARIELLO, C.; LE GLEUHER, M.; HOPKINS, J.; DE STEFANO, M.; DELLEDONNE, M.; PUPPO, A.; BAUDOUIN, E.; FREDO, P. Glutathione synthesis is regulated by nitric oxide in *Medicago truncatula* roots. **Planta**. V. 225, p. 1597 - 1602, 2007.

KEITH, C. S.; HOANG, D. O.; BARRETT, B. M.; FEIGELMAN, B.; NELSON, M. C.; THAI, H.; BAYSDORFER, C. Partial sequence analysis of 130 randomly selected maize cDNA clones. **Plant Physiology**. V. 101, n. 1, p. 329 – 332, 1993.

KOCSY, G.; BALLMOOS, P. von; RÜEGSEGG, A.; SZALAI, G.; GALIBA, G. Increasing the glutathione content in a chilling-sensitive maize genotype using safeners increase protection against chilling-induced injury. **Plant Physiology**. V. 127, p. 1147 - 1156, 2001.

LAMATTINA, L.; GARCIA-MATA, C.; GRAZIANO, M.; PAGNUSSAT, G. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. **Annual Review of Plant Biology**. V. 54, p. 109 – 136, 2003.

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

LEITNER, M.; VANDELLE, E.; GAUPELS, F.; BELLIN, D.; DELLEDONNE, M. NO signals in the haze: Nitric oxide signalling in plant defence. **Current Opinion in Plant Biology**. V. 12, p. 451 – 458, 2009.

LEPINIEC, L.; DEBEAUJON, I.; ROUTABOUL, J-M.; BAUDRY, A.; POURCEL, L.; NESI, N.; CABOCHE, M. Genetics and Biochemistry of Seed Flavonoids. **Annual Review of Plant Biology**. V. 57, p. 405 – 430, 2006.

LESHEM, Y. Y.; PINCHASOV, Y. 2002. Noninvasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch) and avocados *Persea americana* (Mill.). **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 1471–1473, 2002.

LESHEM, Y. Y.; WILLS, R. B. H.; KU, V. V. V. Evidence for the function of the free radical gas nitric oxide (NO) as an endogenous regulating factor in higher plants. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 36, p. 825–833, 1998.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: Manual de Identificação e cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil, v. 1. Nova Odessa: Plantarum, 1998.

MATUS, J. T.; AQUEA, F.; ARCE-JOHNSON, P. Analysis of the grape MYB R2R3 subfamily reveals expanded wine quality-related clades and conserved gene structure organization across *Vitis* and *Arabidopsis* genomes. **BMC Plant Biology**. V. 8, n. 83, 2008.

MEHRTENS, F.; KRANZ, H.; BEDNAREK, P.; WEISSHAAR, B. The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. **Plant Physiology**. V. 138, p. 1083 – 1096, 2005.

MEYER, J. W.; SCHMITT, M. E. A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. **FEBS Letters**. V. 472, p. 1 – 4, 2000.

MIYAKE, K.; ITO, T.; SENDA, M.; ISHIKAWA, R.; HARADA, T.; NIIZEKI, M.; AKADA, S. Isolation of a subfamily of genes for R2R3-MYB transcription factors showing up-regulated expression under nitrogen nutrient-limited conditions. **Plant Molecular Biology**. V. 53, p. 237–245, 2003.

MURGIA, I.; DE PINTO, M. C.; DELLEDONNE, M.; SOAVE, C.; DE GARA, L. Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death, and cell redox state in plant cells. **Journal of Plant Physiology**. V. 161, p. 777 – 783, 2004a.

MURGIA, I.; TARANTINO, D.; VANNINI, C.; BRACALE, M.; CARRAVIERI, S.; SOAVE, C. *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photo-oxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. **The Plant Journal**. V. 38, p. 940 – 953, 2004b.

NEIL, S.; BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.; HARRISON, J.; WILSON, I. Nitric oxide evolution and perception. **Journal of Experimental Botany**. V. 59 p.1-11, 2007

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

OGATA, K.; HOJOT, H.; AIMOTO, S.; NAKAI, T.; NAKAMURA, H.; SARAI, A.; ISHII, S.; NISHIMURA, Y. Solution structure of a DNA-binding unit of Myb: A helix-turn-helix-related motif with conserved tryptophans forming a hydrophobic core. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 89, p. 6428 – 6432, 1992.

PAGNUSSAT, G. C.; SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S.; LAMATTINA, L. Nitric oxide is required for root organogenesis. **Plant Physiology**. V.129, p. 954 - 956, 2002.

PARANI, M. R.; MYERS, R.; WEIRICH, H.; SMITH, B.; LEAMAN, D. W.; GOLDMAN, S. L. Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. **Plant Biotechnology Journal**. V. 2, p. 359 – 366, 2004.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. V. 67, p. 1035 – 1042, 2000.

POLVERARI, A.; MOLESINI, B.; PEZZOTTI, M.; BUONAURO, R.; MARTE, M.; DELLEDONNE, M. Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. V. 16, p. 1094 – 1105, 2003.

RABINOWICZ, P. D.; BRAUN, E. L.; WOLFE, A. D.; BOWEN, B.; GROTEWOLD, E. Maize *R2R3 Myb* Genes: sequence analysis reveals amplification in the higher plants. **Genetics**. V. 153, p. 427 – 444, 1999.

RANGARAJAN, S.; RAJ, M. L. S.; HERNANDEZ, J.; M., GROTEWOLD, E.; GOPALAN, V. RNase P as a tool for disruption of gene expression in maize cells. **Biochemistry Journal**. V. 380, p. 611 – 616, 2004.

RIGANTI, C.; COSTAMAGNA, C.; DOUBLIER, S.; MIRAGLIA, E.; POLIMENI, M.; BOSIA, A. The NADPH oxidase inhibitor apocynin induces nitric oxide synthesis via oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**. V. 228, p. 277 – 285, 2008.

RIST, M. J.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Nutrition and food science go genomic. **Trends in Biotechnology**. V. 24, n. 4, p. 172-178, 2006.

ROCKEL, P.; STRUBE, F.; ROCKEL, A.; WILDT, J.; KAISER, W. M. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. **Journal of Experimental Botany**. V. 53, p. 103 - 110, 2002.

SAIKUMAR, P.; MURALI, R.; REDDY, E. P. Role of tryptophan repeats and flanking amino acids in Myb-DNA interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 87, p. 8452 – 8456, 1990.

SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; SCHERER, G. F. E.; FLOH, E. I. S. Polyamine and nitric oxide levels relate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. **Plant Cell Tissue Organ Cult**. V. 90, p. 93 – 101, 2007.

SCHÄFER, E.; KUNKEL, T.; FROHNMEYER, H. Signal transduction in the photocontrol of chalcone synthase gene expression. **Plant Cell Environment**. V. 20, p. 722 - 727, 1997.

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

SERPA, V.; VERNAL, J.; LAMATTINA, L.; GROTEWOLD, E.; CASSIA, R.; TEREZI, H. Inhibition of *At*MYB2 DNA-binding by nitric oxide involves cysteine S-nitrosylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 361, p. 1048 – 1053, 2007.

SHI, S.; WANG, G.; WANG, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, L. Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. **Nitric Oxide**. V. 13, p. 1 - 9, 2005.

SHIRLEY, B. W. Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. **Seed Science**. V. 8, p. 415 –422, 1998.

SILVEIRA, V.; STEINER, N.; SANTOS, A. L. W.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biotechnology tools in *Araucaria angustifolia* conservation and improvement: inductive factors affecting somatic embryogenesis. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. V. 2, n. 3, p. 463 – 470, 2002.

SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; TUN, N. N.; SCHERER, G. F. E.; HANDRO, W.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. I. S. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **Plant Science**. V. 171, p. 91 - 98, 2006.

STEINER, N.; Vieira, F. do N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Carbon Source Affects Morphogenesis and Histodifferentiation of *A. angustifolia* Embryogenic Cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. V. 48, n. 6, p. 895-903, 2005.

STEFFEN, Y.; SCHEWE, T.; SIES, H. (–)-Epicatechin elevates nitric oxide in endothelial cells via inhibition of NADPH oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 359, p. 828 – 33, 2007.

STRACKE, R.; WERBER, M.; WEISSHAAR, B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Current Opinion in Plant Biology**. V. 4, p. 447 – 456, 2001.

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

SUI, Z.; NIU, L.; YUE, G.; YANG, A.; ZHANG, J. Cloning and expression analysis of some genes involved in the phosphoinositide and phospholipid signaling pathways from maize (*Zea mays* L.). **Gene**. V. 426, p. 47 – 56, 2008.

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 – 1341, 2009.

VAILLEAU, F.; DANIEL, X.; TRONCHET, M.; MONTILLET, J. L.; TRIANTAPHYLIDE, C.; ROBY, D. A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 99, n. 15, p. 10179 – 10184, 2002.

VANDERAUWERA, S.; ZIMMERMANN, P.; ROMBAUTS, S.; VANDENABEELE, S.; LANGEBARTELS, C.; GRUISSEM, W.; et al. Genome wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. **Plant Physiology**. V. 139, p. 806–821, 2005.

WANG, P. G.; XIAN, M.; TANG, X.; WU, X.; WEN, Z.; CAI, T.; JANCZUK, A.J. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. **Chemical Reviews**. V. 102, p. 1091 – 1134, 2002.

WEICHSEL, A.; MAES, E. M.; ANDERSEN, J. F.; VALENZUELA, J. G.; SHOKHIREVA, T. A.; WALKER, F. A.; MONTFORT, W. R. Heme-assisted S-nitrosation of a proximal thiolate in a nitric oxide transport protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 102, p. 594 - 599, 2005.

WILSON, I. D.; NEILL, S. J.; HANCOCK, J. T. Nitric oxide synthesis and signaling in plants. **Plant Cell Environment**. V. 31, p. 622 – 631, 2008.

WINKEL-SHIRLEY B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Current Opinion in Plant Biology**. V. 5, p. 218 – 223, 2002.

YANHUI, C.; XIAOYUAN, Y.; KUN, H.; MEIHUA, L.; JIGANG, L.; ZHAOFENG, G.; ZHIQIANG, L.; YUNFEI, Z.; XIAOXIAO, W.; XIAOMING, Q.; YUNPING S.; LI Z.; XIAOHUI, D.; JINGCHU, L.; XING-WANG, D.; ZHANGLIANG, C.; HONGYA, G.; LI-JIA, Q. The MYB transcription factor Superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. **Plant Molecular Biology**. V. 60, n. 1, p. 107 – 24, 2006.

ZEIER, J.; DELLEDONNE, M.; MISHINA, T.; SEVERI, E.; SONODA, M.; LAMB, C. Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant–pathogen interactions. **Plant Physiology**. V. 136, p. 2875 – 2886, 2004.

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