

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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE PLANTAS DE ARROZ  
(*Oryza sativa*) SILENCIADAS NO GENE DE UMA ASCORBATO PEROXIDASE  
PEROXISSOMAL (*OsAPX4*)**

**RAYANNE JOHAN BRUM**

Porto Alegre

- 2017-

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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE PLANTAS DE ARROZ**  
**(*Oryza sativa*) SILENCIADAS NO GENE QUE CODIFICA UMA ASCORBATO**  
**PEROXIDASE PEROXISSOMAL (*OsAPX4*)**

**RAYANNE JOHAN BRUM**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração: Genética e Biologia Molecular

Orientadora

**Prof. Dra Márcia Pinheiro Margis**

Co-orientadora

**Dra. Ana Paula Körbes**

Porto Alegre

Abril- 2017

*Dedico esta dissertação a os meus familiares,  
em especial minha mãe Vera e meu pai Olmir.*

## **AGRADECIMENTOS**

A realização dessa dissertação de Mestrado contou com importantes incentivadores.

Agradeço:

- A Deus pelo dom da vida, por mostrar-me sempre o caminho, por me dar saúde e força para sempre persistir.
- A Doutora Márcia Pinheiro Margis, pela oportunidade, orientação, saberes transmitidos, opiniões críticas, disponibilidade e palavras de incentivo.
- A minha co-orientadora Ana Korbes, pelos ensinamentos e apoio.
- A Doutora Eliane Kaltchuk, pela total disponibilidade e ensinamentos citogenéticos.
- A Doutora Andréia Turchetto, pela possibilidade de realizar a prática didática.
- Aos meus colegas de laboratório do NGFP-UFRGS, discípulos, pelo auxílio técnico e pela amizade de sempre.
- A minha amiga Silmara, pelos ensinamentos agronômicos e paciência.
- Ao Frank, pelas análises do transcriptoma.
- Ao César, por todo suporte emocional, pelas correções realizadas, caronas, paciência e amor.
- Por último, tendo consciência que sozinha nada disso seria possível, dirijo um agradecimento especial aos meus pais, exemplos de coragem, amor e superação, pelo apoio emocional, pelas longas conversas e pela sabedoria a mim transmitida.



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE TABELAS .....	12
ABSTRACT .....	15
1.0- INTRODUÇÃO .....	16
1.1- Espécies reativas de Oxigênio.....	16
1.2- Mecanismos de neutralização de ERO.....	17
1.2.1- Mecanismos não enzimáticos no controle de ERO .....	18
1.2.2- Mecanismos enzimáticos de controle de ERO .....	18
1.2.2.1- Ascorbato peroxidase .....	19
1.3- Os peroxissomos .....	21
1.4- Senescência .....	22
1.5- O arroz como modelo de estudo.....	23
2.0- OBJETIVOS .....	25
Objetivo geral.....	25
Objetivos específicos .....	25
3.0- MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1- Material vegetal .....	25
3.2- Análises <i>in silico</i> da expressão gênica de OsAPX4.....	26
3.3- Isolamento de RNA e análise de qualidade .....	27
3.4- Sequenciamento de RNA em larga escala .....	27
3.5- Análise da expressão diferencial .....	27
3.6- Material vegetal para análise fenotípica.....	28
3.6.1- Análise da coloração foliar.....	29
3.6.2- Análise do pólen .....	30
3.6.3- Análise da atividade fotossintética.....	31
3.6.4- Quantificação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	32
3.6.5- Análise da produção .....	32
3.7- Senescência induzida .....	32
3.8- Análise estatística .....	33

4.0- RESULTADOS.....	33
4.1- Caracterização Molecular .....	33
4.1.1- Análises <i>in silico</i> da expressão gênica de OsAPX4.....	33
4.1.2- Sequenciamento em larga escala de plantas RNAiOsAPX4.....	35
4.2- Caracterização Fenotípica .....	47
4.2.1- Análise da coloração foliar.....	47
4.2.2- Análise da altura .....	49
4.2.3- Análise do pólen .....	50
4.2.4- Análise fotossintética .....	53
4.2.5- Quantificação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	55
4.2.6- Análise da produção .....	56
4.2.7- Senescência Induzida.....	57
5.0- DISCUSSÃO .....	59
6.0- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	63
7.0- BIBLIOGRAFIA .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

1. **ABA-** Ácido Abscísico
2. **AIA-** Ácido indol-3-acético
3. **AIB-** Ácido indol-3-butírico
4. **AJ-** Ácido Jasmônico
5. **APX-** Ascorbato peroxidase
6. **APX3-** Ascorbato peroxidase 3
7. **ASA-** Ascorbato
8. **cAPX-** Ascorbato peroxidase citosólica
9. **CAT-** Catalase
10. **chAPX-** Ascorbato peroxidase cloroplastídica
11. **CO<sub>2</sub>-** Gás carbônico
12. **CONAB-** Companhia Nacional de Abastecimento
13. **C=O-** Carbonilo excitado
14. **DHA-** Dehidroascorbato
15. **DHAR-** Dehidroascorbato redutase
16. **ERO-** Espécies reativas de oxigênio
17. **FDA-** Fluoresceína de diacetato
18. **GOX-** Glicolato oxidase
19. **GR-** Glutathiona redutase
20. **GSH-** Glutathiona
21. **GSSG-** Glutathiona oxidada
22. **GPX-** Glutathiona peroxidase
23. **MDAR-** Monodehidroascorbato redutase
24. **mitAPX-** Ascorbato peroxidase mitocondrial
25. **MDA-** Monodehidroascorbato
26. **NAD(P)H-** Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
27. **NT-** Não transformadas
28. **O<sub>2</sub>-** Oxigênio
29. **O<sub>2</sub><sup>-</sup> -** Radical superóxido
30. **O<sub>2</sub><sup>\*</sup>-** Radical singleto
31. **OH<sup>+</sup> -** Radical hidroxila



32. **OsAPX1**- Gene da Ascorbato peroxidase 1 de *Oryza sativa*.
33. **OsAPX2**- Gene da Ascorbato peroxidase 2 de *Oryza sativa*.
34. **OsAPX4**- Gene da Ascorbato peroxidase 4 de *Oryza sativa*.
35. **OsAPX8**- Gene da Ascorbato peroxidase 8 de *Oryza sativa*.
36. **pAPX**- Ascorbato peroxidase peroxissomal
37. **RNAi OsAPX4**- Plantas silenciadas para o gene OsAPX4 de *Oryza sativa*.
38. **SAGs**- Genes associados a senescência
39. **sAPX**- Ascorbato peroxidase estromal
40. **SOD**- Superóxido dismutase
41. **tAPX**- Ascorbato peroxidase tilacoidal
42. **3-AT**- 3- Amino-1,2,4- triazol.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1-** Ciclo da Ascorbato Glutathiona

**Figura 2-** Padrão de coloração foliar para avaliação da entrada dos estádios e processo de senescência nas plantas RNAiOsAPX4 e NT.

**Figura 3-** Perfil de expressão *in silico* de OsAPX4 em diferentes tecidos e fases de desenvolvimento do arroz.

**Figura 4-** Pictografia de fluorescência eletrônica da expressão de OsAPX4 (LOC\_Os08g43560) em segmentos de folhas de arroz

**Figura 5-** Registros fotográficos representativo do cultivo de arroz em casa de vegetação.

**Figura 6-** Desenho esquemático da metodologia de amostragem.

**Figura 7-** Seleção de amostras de RNA de folhas L1 e L2 de plantas NT e RNAiOsAPX4 que foram utilizadas para a construção das bibliotecas de sequenciamento.

**Figura 8-** Diagrama de Venn com o número de genes com expressão diferencial entre as amostras (*fold-change*  $\geq 2$ ).

**Figura 9-** Análise foliar do estádio V4.

**Figura 10-** Análise fenotípica das plantas RNAiOsAPX4 e NT ao longo do desenvolvimento.

**Figura 11-** Análise da altura das plantas RNAiOsAPX4 e NT, medida aos 40 dias.

**Figura 12-** Análise da viabilidade dos grãos de pólen das linhagens RNAiOsAPX4 e NT.

**Figura 13-** Diferenciação dos grãos-de-pólen viáveis dos inviáveis.

**Figura 14-** Análise do número de grãos de polén por antera via método de coloração de Alexander das plantas RNAiOsAPX4 e NT.

**Figura 15-** Avaliação fotossintética referente ao rendimento quântico efetivo do fotossistema II (PSII) das folhas bandeira, das plantas RNAiOsAPX4 e NT.

**Figura 16-** Avaliação fotossintética do transporte relativo de elétrons do Fotossistema II das plantas RNAiOsAPX4 e NT.

**Figura 17-** Quantificação de clorofila de folhas bandeiras, via SPAD- 502 Plus.

**Figura 18-** Análise do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das plantas RNAiOsAPX4 e NT.

**Figura 19-** Cálculo de rendimento médio de grãos por genótipo.

**Figura 20-** Indução de senescência em plantas RNAiOsAPX e NT, condição claro e escuro.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Estádios de desenvolvimento do arroz segundo normas de Recomendação Técnica de Pesquisa do Sul do Brasil (SOSBAI).

**Tabela 2-** Quantificação e resultado da análise qualitativa realizada com o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer

**Tabela 3-** Relatório de qualidade das bibliotecas de sequenciamento Illumina gerados pelo software FastQC.

**Tabela 4-** Lista de genes diferencialmente expressos em folhas L2 de plantas RNAiOsAPX4

**Tabela 5-** Acompanhamento dos estádios de desenvolvimento das linhagens RNAiOsAPX4 e NT.

## RESUMO

### **Caracterização molecular e fenotípica de plantas de arroz (*Oryza sativa*) silenciadas no gene que codifica uma ascorbato peroxidase peroxissomal (*OsAPX4*)**

**Autor: Rayanne Johan Brum**

**Orientadora: Márcia Pinheiro Margis**

**Co-orientadora: Ana Paula Korbes**

A enzima ascorbato peroxidase (APX) desempenha um papel essencial no controle dos níveis intracelulares de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O  $H_2O_2$  é uma molécula continuamente produzida pelo metabolismo aeróbio, sendo citotóxica quando presente em níveis elevados, mas em níveis adequados pode atuar como uma molécula de sinalização. Para entender a função de um gene que codifica uma APX peroxissomal (*OsAPX4*) do arroz (*Oryza sativa* L), foram estudadas linhagens transgênicas silenciadas no referido gene (*RNAiOsAPX4*), através de uma caracterização fenotípica detalhada ao longo dos diferentes estádios de desenvolvimento. Após 40 dias de crescimento, as plantas *RNAiOsAPX4* apresentaram maior número de folhas senescentes quando comparadas com as plantas não transformadas (NT). No entanto, as plantas não apresentaram diferenças significativas em altura, no conteúdo de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nos parâmetros de eficiência do fotosistema II das folhas bandeira. Curiosamente, as plantas *RNAiOsAPX4* apresentaram floração antecipada, de aproximadamente uma semana em relação às plantas NT. A viabilidade do pólen e o número de grãos de pólen por antera não diferiram entre os genótipos. Além disso, os fragmentos de folhas *RNAiOsAPX4* foram mais suscetíveis à senescência induzida por escuro. Foi realizada uma análise de transcriptoma para identificar os genes diferencialmente expressos em plantas *RNAiOsAPX4* e NT, comparando bibliotecas de mRNA preparadas de folhas de diferentes idades de uma mesma planta (análise ainda está sendo concluída). As comparações realizadas nesta análise demonstraram que as folhas 1 (folha mais antiga) das plantas *RNAiOsAPX4* e NT, possui 11 genes

diferencialmente expressos com “fold-change” maior ou igual a 2, enquanto que as comparações realizadas entre as bibliotecas preparadas com o material das folhas 2 (folha mais jovem) mostraram 71 genes diferencialmente expressos e cinco genes sobrepostos nas plantas transformadas e não-transformadas. A comparação entre as bibliotecas das folhas 1 e 2 da mesma planta mostrou apenas 2 genes diferencialmente expressos em plantas RNAiOsAPX4 e nenhum gene em plantas NT. Em conclusão, o silenciamento do gene *OsAPX4*, por conseguinte, a menor expressão de seu produto não afeta o crescimento da planta, mas influencia o tempo de floração e a senescência foliar, sugerindo um papel importante para o gene *OsAPX4* na sinalização de ERO.

**ABSTRACT****Molecular and phenotypic characterization of rice plants silenced (*Oryza sativa*) for a gene encoding a peroxisomal Ascorbate peroxidase gene (*OsAPX4*)****Author: Rayanne Johan Brum****Guiding: Márcia Pinheiro Margis****Co- supervisor: Ana Paula Korbes**

Ascorbate peroxidase (APX) enzyme plays an essential role in the control of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which is continually produced by aerobic metabolism, is a cytotoxic molecule when in high levels, but in low levels it can act as a signalling molecule. To understand the function of a gene encoding a peroxisomal APX (*OsAPX4*) from rice (*Oryza sativa* L), silenced transgenic lines (RNAi*OsAPX4*) were studied. A careful phenotypic characterization was carried out, following all growth stages of RNAi*OsAPX4* and non transformed plants (NT). Under growth chamber conditions, 40 days old RNAi*OsAPX4* plants clearly displayed more senescent leaves than NT plants. However, the plants did not present significant differences in height, in the ROS content on flag leaves and in efficiency parameters of photosystem II of flag leaves. Interestingly, RNAi*OsAPX4* plants started to flower a week earlier than NT plants. Assessments of pollen viability and the number of pollen grains per anther did not differ between genotypes. In addition, RNAi*OsAPX4* leaf fragments were more susceptible to dark induced senescence. A transcriptome analysis to identify differentially expressed genes in RNAi*OsAPX4* and NT plants was performed comparing leaves of different ages within a plant and the results are under evaluation. The comparisons between leaf 1 (older leaf) of RNAi*OsAPX4* and NT plants showed 11 genes differentially expressed with  $\geq 2$  fold-change, while the comparisons of leaf 2 (younger leaf) showed 71 genes differentially expressed, with five overlapping genes. The comparison between leaves 1 and 2 within the same plant showed only 2 genes differentially expressed in RNAi*OsAPX4* plants and no genes in NT plants. In conclusion, silencing of *OsAPX4* gene does not affect plant growth, but it does

influence flowering time and leaf senescence, suggesting a role for *OsAPX4* gene in ROS signaling.

## 1.0- INTRODUÇÃO

### 1.1 Espécies reativas de Oxigênio

O acúmulo de oxigênio molecular ( $O_2$ ) na atmosfera terrestre permitiu que organismos aeróbicos o usassem comoceptor terminal de elétrons, durante a respiração celular. O  $O_2$  em seu estado fundamental é não-reativo, mas as reações metabólicas, como a fotossíntese e a respiração celular, propiciam a redução parcial da molécula de  $O_2$ , originando estados excitados e reativos, tais como espécies reativas de oxigênio (ERO) e seus derivados. As ERO são, portanto, subprodutos inevitáveis do metabolismo celular regular (FOYER; NOCTOR, 2005).

Os processos metabólicos dependentes do oxigênio, como a respiração, fotossíntese e fotorrespiração, levam à produção de ERO nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos, respectivamente. A cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias e cloroplastos, não é apenas força motriz do metabolismo celular, mas também geradora de sinais redox, que participam e regulam processos biológicos das plantas, mediante a formação de ERO (ASADA, 2006, NELSON, DAVID L; M. COX, 2014). Nos peroxissomos a produção de ERO ocorre via as enzimas oxidases e ureases. Além dessas enzimas, a via de sistema de transporte da cadeia peroxissomal, o metabolismo de ácido jasmônico e auxina, oxidação de ácidos graxos e a fotorrespiração também são responsáveis por parte dessa produção. Destaca-se como maior fonte produtora de  $H_2O_2$  no peroxissomo, a reação fotorrespiratória da enzima Glicolato oxidase (GOX), a qual tem como principal função a quebra das moléculas de glicose (SANDALIO, 2015).

As principais ERO produzidas pelo metabolismo celular são o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), o radical hidroperóxido ( $HO_2^{\cdot}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical alcoxi ( $R_{\cdot}O$ ), o radical peroxi ( $ROOH$ ), o oxigênio singleto ( $O_2^{\cdot}$ ) e o carbonilo excitado ( $C=O$ ). Estas moléculas podem atacar praticamente todas as macromoléculas, o que resulta em graves danos aos componentes celulares, lesões de DNA e mutações. Assim, uma alta concentração de ERO pode levar a uma



irreparável disfunção metabólica e à morte celular (SCANDALIOS, 2002). Entretanto, em pequenas quantidades, as ERO podem atuar como moléculas importantes na via de sinalização das plantas. Para serem consideradas moléculas de sinalização, as ERO necessitam ter os seguintes requisitos: serem produzidas por células quando estimuladas, ter ação na célula na qual é produzida ou células intermediárias, e quando removidas do seu meio o sinal deve ser revertido (MACHADO et al., 2005). Devido a sua alta estabilidade, o  $H_2O_2$  destaca-se entre as ERO por estar envolvido em uma série de processos fisiológicos das plantas (NOCTOR; FOYER, 2016). Acredita-se que, em baixas concentrações, esta espécie possa participar do processo de sinalização para desencadear a aclimatação das plantas a estresses bióticos e abióticos (QUAN et al., 2008). Condições de estresse biótico ou abiótico levam a aumento na produção de ERO nos cloroplastos e mitocôndrias. Esse aumento está relacionado ao fato de que essas organelas apresentam alta atividade de oxidação metabólica e intenso fluxo de elétrons. Assim, qualquer perturbação no equilíbrio entre a produção e a eliminação de ERO pode causar danos severos às células (SCANDALIOS, 2002; MITTLER, 2002; GILL; TUTEJA, 2010). Por isso, para que a integridade celular seja mantida, as células contam com diversos mecanismos de neutralização das ERO, que garantem a homeostase redox (FOYER; NOCTOR, 2005). Sob condições normais, a produção de ERO nas células é mantida em níveis basais, devido a presença de mecanismos que controlam a produção e o acúmulo dessas moléculas, incluindo a ação de enzimas antioxidantes. Apesar disso, este equilíbrio pode ser perturbado a partir do esgotamento dessas enzimas, o que é chamado de ponto de saturação da enzima, no qual há um acúmulo de ERO acarretando um estresse oxidativo e, conseqüentemente, danos aos cloroplastos, à parede celular, às mitocôndrias entre outras estruturas (DEL RIO et al., 1998).

## **1.2- Mecanismos de neutralização de ERO**

A manutenção da homeostase redox depende de um delicado equilíbrio entre produção e eliminação de ERO. Para isso, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos de regulação, com funções antioxidantes eficazes para a degradação de ERO, possibilitando também a redução dos danos causados por essas moléculas

(SCANDALIOS, 2002). Os principais mecanismos de regulação utilizam moléculas antioxidantes ou dependem de enzimas antioxidantes.

### **1.2.1- Mecanismos não enzimáticos no controle de ERO**

Neste sistema o estado redox da célula é determinado por moléculas antioxidantes, principalmente o ascorbato (AsA), a glutathiona (GSH), o NAD(P)H e proteínas da superfamília das tioredoxinas, bem como os compostos fenólicos, quercetina, carotenóides, citocromos, tocoferóis, tocotrienóis, poliaminas, metabólitos secundários e proteínas contendo grupos-S redox-ativos (FOYER; NOCTOR, 2011; POTTERS; HOREMANS; JANSEN, 2010). O AsA e a GSH destacam-se nesse sistema, uma vez que exercem o papel de tampões antioxidantes. Ambos são abundantes e estáveis, com apropriado potencial redox e interagem com numerosos componentes e vias. Essas moléculas são mantidas geralmente no seu estado reduzido por um conjunto de enzimas dependentes de NAD(P)H (FOYER; NOCTOR, 2005, 2011).

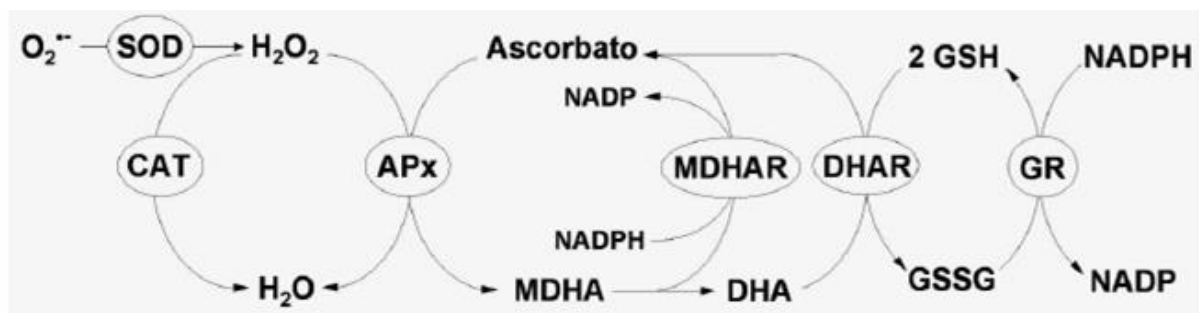
### **1.2.2- Mecanismos enzimáticos de controle de ERO**

O sistema enzimático desenvolvido em organismos aeróbicos inclui um conjunto de enzimas-chave, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutathiona peroxidase (GPX) (SHIGEOKA et al., 2002). O balanço entre as atividades de SOD, APX e CAT é crítico para determinar o nível intracelular efetivo das espécies reativas de oxigênio (MITTLER et al., 2004). As SODs são as primeiras a defenderem o organismo contra as ERO, dismutando o superóxido a peróxido de hidrogênio. As enzimas APX, GPX e CAT subsequentemente detoxificam o peróxido de hidrogênio. Sabe-se que a APX apresenta maior afinidade por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que CAT, fato este que sugere diferentes funções entre elas. A APX parece estar envolvida na fina modulação de ERO, enquanto a CAT possivelmente atua na remoção de ERO durante estresse (MITTLER, 2002). Ao contrário da CAT, a APX requer um sistema de regeneração do ascorbato e GSH, o ciclo do ascorbato-glutathiona. O balanço das atividades de SOD, APX e CAT parece ser muito importante

para redução dos níveis tóxicos de ERO na célula, sendo que alterações nesse balanço parecem induzir mecanismos compensatórios (APEL; HIRT, 2004).

### 1.2.2.1- Ascorbato peroxidase

Ascorbato peroxidases (APX, EC 1.11.1.11) são heme-peroxidases de classe I e estão envolvidas na remoção do peróxido de hidrogênio das células das plantas, protegendo-as dos efeitos tóxicos das ERO (APEL; HIRT, 2004). Estas enzimas utilizam o ascorbato como doador de elétrons para a redução do peróxido de hidrogênio à água (YAN et al., 2006). O ascorbato é o antioxidante solúvel mais abundante das células animais e vegetais e a APX é um componente integral do ciclo glutathiona-ascorbato. Neste ciclo, após a redução de  $H_2O_2$  à água pela APX, o ascorbato oxidado (monodehidroascorbato - MDHA) é regenerado pela enzima monodehidroascorbato redutase (MDHAR). Entretanto, MDHA é um radical instável e, se não for rapidamente reduzido, se converte em ascorbato e dehidroascorbato (DHA). Dehidroascorbato é reduzido em ascorbato pela dehidroascorbato redutase (DHAR), às custas de GSH, produzindo glutathiona oxidada (GSSG). Por fim, GSSG é reduzido pela glutathiona redutase (GR) usando NADPH como doador de elétron (Fig.1).



**Figura 1-** Ciclo da Ascorbato Glutationa (TEIXEIRA et.al., 2004).

Um número crescente de trabalhos (BONIFACIO et al., 2011; CAVERZAN et al., 2012; DEL RIO et al., 1998 ; FOYER; NOCTOR, 2011; LU; TAKANO; LIU, 2005; MELOROSE; PERROY; CAREAS, 2015; TEIXEIRA et al., 2004), demonstra que ascorbato e glutathiona são peças-chave do eixo-redox da célula, integrando informações metabólicas e estímulos ambientais para ajustar as respostas no contexto de uma rede de sinalização celular (CHRISTINE H. FOYER AND GRAHAM

NOCTOR, 2009). Assim, enzimas APX tem como papel principal proteger as células contra as ações do peróxido de hidrogênio sob condições normais, bem como sob condições estressantes.

As enzimas APX são encontradas em diversos compartimentos celulares. A localização subcelular das APX está diretamente relacionada com a presença de peptídios sinal organela-específicos e domínios transmembrana nas regiões N-terminal e C-terminal de cada enzima (TEIXEIRA et al., 2004). Os tipos ou isoformas já conhecidos são: cAPX (citosólica), chlAPX (cloroplastídica), sAPX (estromal), tAPX (tilacoidal), pAPX (ligada a membrana, glicossomos e peroxissomos) e mitAPX (mitocondrial). Várias isoformas de APX têm sido descritas em diversas espécies de plantas, como batata (KIM et al., 2015), tomate (NAJAMI et al., 2008), laranja (TAJVAR et al., 2011), soja (DE VASCONCELOS et al., 2009), entre outras. Em arroz, estudos anteriores identificaram uma família multigênica com oito genes, que codificam isoformas de ascorbato peroxidases, denominados de *OsAPX1* a *OsAPX8* (TEIXEIRA et al., 2004).

Apesar de muitos estudos terem sido realizados para a caracterização funcional das diferentes APX, o papel específico de cada enzima ainda não foi bem compreendido. Além disso, pouco foi elucidado sobre o papel dessas enzimas em arroz, uma planta modelo entre as monocotiledôneas. Plantas com as APX citosólicas (*OsAPX1* e *OsAPX2*) silenciadas apresentam fenótipo anão, com redução do crescimento e de florescimento (ROSA ET AL., 2010; CAVERZAN et al., 2012). Já plantas silenciadas para as APXs de cloroplasto não apresentaram diferenças de fenótipo em relação a plantas não transformadas (CAVERZAN et al., 2014). As formas mitocondriais e peroxissomais de APX foram ainda pouco estudadas, e, portanto, a sua importância para o metabolismo celular não está bem definida (TOBERGTE; CURTIS, 2013). NARENDRA e colaboradores (2006), concluíram que a isoforma APX3 do peroxissomo de *Arabidopsis* é dispensável para o crescimento e desenvolvimento da planta. Entretanto SOUSA et al., 2015, descrevem o papel da APX3 como compensatório na deficiência de CAT, o que geraria uma aclimação fisiológica, minimizando os efeitos da fotorespiração, algo muito importante para o metabolismo da planta.

Plantas de arroz submetidas à seca apresentaram indução na expressão das APX de peroxissomo (*OsAPX3* e *OsAPX4*) (RIBEIRO, 2012). Em *Arabidopsis thaliana*, a superexpressão da APX3 de peroxissomo resultou em aumento do número de sementes em plantas submetidas à seca e resultou em uma maior tolerância ao estresse por 3-AT (3- Amino-1,2,4- triazol, inibidor de catalase) (YAN et.al., 2006). Por outro lado, o silenciamento das isoformas peroxissomais em arroz parece afetar o tempo de desenvolvimento normal das plantas, uma vez que as mesmas apresentaram senescência precoce em relação às plantas não-transformadas (RIBEIRO, 2012).

### 1.3- Os peroxissomos

Os peroxissomos são organelas pequenas, que contêm enzimas envolvidas em uma variedade de reações metabólicas, incluindo várias relacionadas ao metabolismo energético. Os peroxissomos foram originalmente definidos como organelas que realizam reações de oxidação durante o processo de fotorrespiração, quando a concentração de oxigênio é mais alta que a de gás carbônico, ou durante o catabolismo de lipídeos, quando ocorre a formação de uma grande quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nestas organelas. Por ser possivelmente tóxico para célula, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é removido preferencialmente pelas catalases peroxissomais, que constituem a primeira linha de defesa na remoção dessa molécula na organela. O restante é neutralizado pelas enzimas ascorbato peroxidases, evitando o extravasamento para o citosol (KARYOTOU; DONALDSON, 2005).

Os peroxissomos desempenham dois papéis particularmente importantes nas plantas. Nas sementes são responsáveis pela conversão de ácidos graxos armazenados em carboidratos. Isto ocorre através de uma série de reações do glioxilato designadas como ciclo do glioxilato, que é uma variante do ciclo de ácido cítrico. Já nas folhas, os peroxissomos estão envolvidos no processo de fotorrespiração, que é a absorção de oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) dependente de luz, concomitante a liberação de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a partir de compostos orgânicos (SCHRADER; FAHIMI, 2008; PETERHANSEL et al., 2010). Além disso, essas organelas estão envolvidas na conversão de auxina e na produção do fitormônio jasmonato (APEL; HIRT, 2004). Na produção de jasmonato (AJ), um

composto cíclico derivado do ácido linolênico sai do cloroplasto em direção ao peroxissomo, onde as enzimas da rota de  $\beta$ -oxidação completam a conversão em AJ. Quanto à conversão de auxina, o peroxissomo promove por meio das enzimas de  $\beta$ -oxidação a modificação do ácido indol-3-butírico (AIB) em ácido indol-3-acético (AIA) ou auxina (TAIZ, 2017).

#### **1.4- Senescência**

O ciclo natural da vida da maioria dos organismos vivos compreende o seu desenvolvimento, senescência e morte. A senescência vegetal é definida como o processo de degradação programada e degeneração dependente da idade das células, órgãos ou do organismo inteiro, que o leva à morte (LIM; KIM; NAM, 2007). Esta também é vista como um mecanismo de defesa que permite a planta completar seu ciclo de vida, uma vez que ocorre a remobilização do nitrogênio das folhas velhas para folhas jovens e órgãos reprodutivos. Este processo possibilita que a planta se mantenha estável mesmo em uma condição estressante (SEDIGHEH et al., 2011). Durante o processo de senescência, as células foliares sofrem uma dramática transição em seu metabolismo, que leva à degradação de vários de seus componentes (KIM et al., 2006). Esta degradação pode ser distintamente observada em cloroplastos, onde ocorre a desmontagem do aparelho fotossintético, resultando na redução da eficiência da capacidade fotossintética e conversão de energia (ZHANG et al., 2006). Em contraste, as mitocôndrias e núcleos permanecem intactos até os estágios finais. Entre as alterações metabólicas, pode ser observada a hidrólise de macromoléculas, tais como proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e pigmentos que foram acumulados durante a fase de crescimento (WATANABE et al., 2013). Em plantas anuais como o arroz, estas moléculas hidrolisadas são realocadas para desenvolvimento de sementes (LIM; KIM; NAM, 2007). Observa-se também o aumento na peroxidação lipídica e desestabilização da membrana, os quais estão associados com o aumento de geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (KIM et al., 2006). Essa geração é uma das primeiras respostas das plantas sob estresses abióticos e senescência (CAN; AMASINO, 1997; CAN et al., 1997).

Grandes avanços já foram feitos na caracterização molecular dos fatores que regulam tanto a senescência natural quanto a induzida por estresses abióticos, revelando uma complexa rede molecular regulatória entre fatores de transcrição e

ERO (KHANNA-CHOPRA, 2012). O declínio na atividade de enzimas antioxidantes e o aumento na peroxidação de lipídeos têm sido há muito tempo considerados como possíveis causas para a senescência foliar em diferentes espécies de plantas (DHINDSA; PLUMB-DHINDSA; THORPE, 1981). Além disso, a quantidade total de ascorbato e glutatona, bem como seus respectivos estados redox, têm sido relacionados com o processo de envelhecimento e falência celular (FOYER; NOCTOR, 2011).

Alguns estudos demonstram que o processo de senescência foliar pode ser influenciado por fatores exógenos como: déficit hídrico, que induz a produção de ABA (SIMPSON et al., 2003), etileno, (JING et al., 2005), estresse por escuro (SONG et al., 2014), entre outros fatores que induzem a planta a realizar esta transição. O ABA é um importante hormônio que regula o crescimento e desenvolvimento das plantas em respostas a estresses. Este hormônio promove a senescência foliar, causando amarelecimento das folhas. Além disso, o ABA induz a expressão de vários genes SAGs, genes reconhecidos como marcadores de senescência (LIANG et al., 2014). O hormônio etileno, conhecido como hormônio do amadurecimento, também possui o papel de modular o tempo da senescência. Sua produção aumenta durante a abscisão foliar, a senescência de flores e amadurecimento dos frutos. Sabe-se também que o escuro, injúria mecânica, doenças e estresses fisiológicos podem aumentar essa produção (JING et al., 2005; (SONG et al., 2014).

### **1.5- O arroz como modelo de estudo**

O arroz (*Oryza sativa L.*), pertencente à família *Poaceae*, caracteriza-se por ter um caule que varia de 40 a 150 cm e panículas de tamanhos que variam de 9 a 30 cm, com espiguetas oblongas, com ou sem aristas e apresenta flores com seis anteras, amarelas (SOSBAI, 2014). Esta planta modelo é a terceira maior cultura cerealífera do mundo, caracterizando-se como principal alimento para mais da metade da população mundial. Em países em desenvolvimento, tais como o Brasil, esta cultura tem desempenhado papel estratégico em níveis econômico e social (WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008).

No âmbito científico, o arroz é considerado uma planta modelo entre as monocotiledôneas (GOFF, 1999). Este apresenta genoma sequenciado (390 mega

bases), o qual é relativamente pequeno em relação aos genomas dos demais cereais. Uma versão do genoma do arroz sequenciado foi publicada pelo International Rice Genome Sequence Project (IRGSP, 2005). Posteriormente, em 2007, uma anotação acurada do genoma de *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* foi publicada, sugerindo que o número de genes em arroz é aproximadamente 32.000 genes (The Rice Annotation Project, 2007).

Nos últimos anos, a produção mundial de arroz não tem acompanhado o crescimento do consumo. Este problema está intimamente relacionado com estresses causados por fatores abióticos, como a salinidade, a seca, o frio ou as altas temperaturas, principalmente em culturas irrigadas. Segundo dados do IRGA (Instituto Riograndense do Arroz) a área aproximada de plantio mundial é de 158 milhões de hectares, que produziram cerca de 590 milhões de toneladas/ano. No Brasil, segundo dados do CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) na safra de 2014/2015, foram plantadas aproximadamente 2.295,1 mil hectares, o que gerou um total de 12,44 milhões de toneladas de arroz. Em 2015, no Rio Grande do Sul foram plantadas cerca de 1,121 milhão de hectares, onde estimou-se uma produção 7.6 kg/ha (SOSBAI, 2014). Estima-se que a população mundial chegará a nove bilhões em 2050, portanto, há necessidade de aumento da produção desse cereal a fim de que se possa alimentar este adicional de dois bilhões de pessoas (ASHIKARI; MA, 2015). Desta forma, é de sumo interesse estudos que possibilitem o entendimento dos mecanismos metabólicos desta planta, uma vez que estes possam permitir o desenvolvimento de estratégias visando um aumento da sua produtividade.



## 2.0- OBJETIVOS

### Objetivo geral

Caracterizar molecular e fenotipicamente plantas de arroz silenciadas para um gene que codifica uma APX peroxissomal.

### Objetivos específicos

- Avaliar a morfologia dos diferentes estádios de desenvolvimento de plantas silenciadas para o gene *OsAPX4*.
- Analisar o transcriptoma de folhas de diferentes idades em ambos os genótipos (WT e RNAiAPX4).
- Avaliar a resposta à senescência induzida de plantas silenciadas para as diferentes APX.

## 3.0- MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1- Material vegetal

Para obtenção do material vegetal para RNA-seq, foram germinadas sementes da linhagem RNAi-APX4J, plantas silenciadas desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa, e sementes não transformadas (Nipponbare) em papel filtro umedecido com água (Nipponbar) ou água com 50 µg/µl higromicina (RNAi-APX4-J). Como controle, sementes Nipponbare foram germinadas em água com higromicina. Nesta condição, nenhuma semente não transformada conseguiu ultrapassar o estágio de emissão de radícula. Após 7 dias de germinação, as plântulas foram transplantadas para o solo úmido, em vasos de 5 L, e cultivadas em casa de vegetação entre os meses de novembro de 2014 e abril de 2015. Em cada vaso foram plantadas de 2 a 3 plântulas, totalizando 10 plantas por linhagem. Quando as plântulas atingiram cerca de 10-15 cm, realizou-se o alagamento das bandejas e suplementação nutritiva com ~50 g de NPK (Nitrogênio, fósforo e potássio) sólido, fórmula 15-9-12. Ao longo do desenvolvimento as plantas de arroz foram acompanhadas e classificadas de acordo com a literatura. Em 2000, foi criado um método de caracterização morfológica para o

arroz (COUNCE; KEISLING; MITCHELL, 2000). Para elaboração desse método, foi realizada uma avaliação ontogenética, por meio de um sistema que subdivide o crescimento e desenvolvimento da planta em três subperíodos: desenvolvimento da plântula, vegetativo e reprodutivo. Os estádios do desenvolvimento da plântula são identificados pela letra S (“Seadling” ou plântula). Já os estádios vegetativos são identificados pela letra V e por um número que varia de 1 a n. A partir da iniciação da panícula (IP), a escala utiliza a letra R (reprodutivo) associada a um número, que varia de 0 a 9. Esse número indica o estágio de desenvolvimento em que se encontram os grãos. A fase de plântula é dividida em 4 estágios (S0 a S3), que se iniciam com emergência do coleóptilo e radícula e terminam com emergência do prófalo do coleóptilo. Cada fase vegetativa está relacionada com a formação do colar foliar para cada folha emitida durante formação deste. Esses estágios classificam-se em V0 até Vn, onde n é o número final de folhas com colares no caule principal. A fase reprodutiva inicia-se quando o meristema apical se transforma no primórdio da panícula (R0) e termina quando os grãos estão completamente formados e prontos para serem colhidos (R9). Constituída por dez estágios baseados em critérios morfológicos, sendo eles: iniciação da panícula (R0), diferenciação da panícula (R1), formação do colar da folha bandeira (R2), emissão da panícula (R3), antese - uma ou mais espiguetas (R4), expansão dos grãos em comprimento e largura (R5), expansão dos grãos em profundidade (R6), secagem do grão, ao menos um grão da panícula apresenta casca com coloração típica da cultivar (R7), maturidade de um grão isolado (com coloração de casca típica da cultivar) (R8) e maturidade completa da panícula (R9). Em abril de 2015, para a realização do RNA-seq, foram coletadas as folhas L1, L2 e L3 de plantas de arroz no estágio R9 de desenvolvimento, que foram divididas em segmentos basal, médio e apical. As amostras foram rapidamente coletadas, medidas, embaladas em alumínio e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Após, foram estocadas em um ultrafreezer a - 80 °C.

### **3.2- Análises *in silico* da expressão gênica de OsAPX4**

O padrão da expressão *in silico* de OsAPX4 foi avaliado em diferentes tecidos e fases de desenvolvimento do arroz. Essa análise foi realizada na plataforma PlaNet, que reúne diferentes experimentos de microarranjos e RNAseq.

### 3.3- Isolamento de RNA e análise de qualidade

O RNA total foi isolado dos fragmentos das folhas de arroz utilizando-se Trizol, seguido de purificação em coluna, conforme as especificações do fabricante (Thermo Fischer Scientific). O precipitado foi dissolvido em água e quantificado em um espectrofotômetro NanoDrop Lite-Thermo scientific. Amostras com a razão 260/280 acima de 1,8 foram consideradas com qualidade satisfatória. Para a verificação visual da integridade do RNA, 80 ng/µl foram aplicados em gel de 1,5 % agarose. No total, 10 amostras foram selecionadas para o sequenciamento, representando a parte média de folhas L1 e L2.

### 3.4- Sequenciamento de RNA em larga escala

Para o sequenciamento, 5 µg de RNA total foram enviados para a Central de Genômica Funcional da Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz De Queiroz”. A avaliação quantitativa e qualitativa das amostras foi realizada por eletroforese em gel utilizando-se o Nano Chip com o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer. A construção de biblioteca de RNA foi realizada com o kit TruSeq RNA sample preparation (FC-122-1001) da Illumina de acordo com as especificações do fabricante. As bibliotecas foram amplificadas por PCR em 15 ciclos, purificadas e selecionadas por tamanho para ~ 300 pb num gel ultra-agarose de baixa gama a 2% (BIO-RAD). O bioanalisador Agilent 2100 foi utilizado para verificar a qualidade do RNA e das bibliotecas. O sequenciamento pair-end (100 bp) foi realizado em um equipamento Illumina HiSeq 2500 V4, utilizando-se 12 amostras por “lane”.

### 3.5- Análise da expressão diferencial

A presença de adaptadores e a qualidade dos reads produzidos pelo sequenciamento foi determinada para cada biblioteca utilizando o software FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Com base nestes dados, o “software” Trim Galore, ([http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/)) foi utilizado para eliminar as sequências dos reads com uma qualidade abaixo de 25, assim como as sequências dos adaptadores universais da Illumina. Em seguida, os “reads” limpos

foram ancorados com TopHat2 (KIM et al., 2013) ao genoma de arroz (*O. sativa japonica cv. Nipponbare* versão IRGSP-1.0.31.gtf) obtido do Ensembl Plants (<http://plants.ensembl.org/index.html>) utilizando a opção “fr-first strand”. Esta opção foi usada considerando a metodologia usada na preparação das bibliotecas (Strand-specific RNAseq) e foi confirmada utilizando o script `infer_experiment.py` do programa RSeQC (WANG; WANG; LI, 2012). As tabelas de contagem dos reads mapeados em cada gene foram geradas com o módulo `featureCounts` do software Subread (LIAO; SMYTH; SHI, 2013) a partir dos arquivos de ancoramento de extensão gerados pelo TopHat2. Os critérios usados para a criação das tabelas de contagem foram: contabilizar fragmentos (pares de reads) em vez de reads individuais, não foram considerados pares de reads que estejam ancorando em cromossomos diferentes ou ancorando no mesmo cromossomo mas em diferentes fitas, não foram considerados reads que ancoram em múltiplos lugares do genoma, e considerando os resultados do RSeQC, foi escolhida a opção “reversely stranded”. Para realizar as análises estatísticas para identificação da expressão diferencial, as tabelas de contagem foram analisadas no pacote DESeq2 versão 1.12.3 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) do Bioconductor, utilizando-se um FDR (False Discovery Rate) de 0.05 e um fold change of 1. Para cada comparação de tratamentos, todos os genes com expressão diferencial menores de 0.05 foram separados em dois grupos: um grupo formado pelos genes “up-regulated” e outro formado pelos genes “down-regulated”. As sequências proteicas destes dois grupos de genes foram obtidas do Ensembl Plants e comparadas ao banco de dados UniRef Enriched KEGG Orthology (UEKO) (GUEDES et al., 2011) utilizando `blastX` local (ALTSCHUL et al., 1997). Os resultados do `blastX` foram processadas no software MySQL (Oracle) e os códigos de KO obtidos foram visualizados no servidor web iPATH2 (YAMADA et al., 2011).

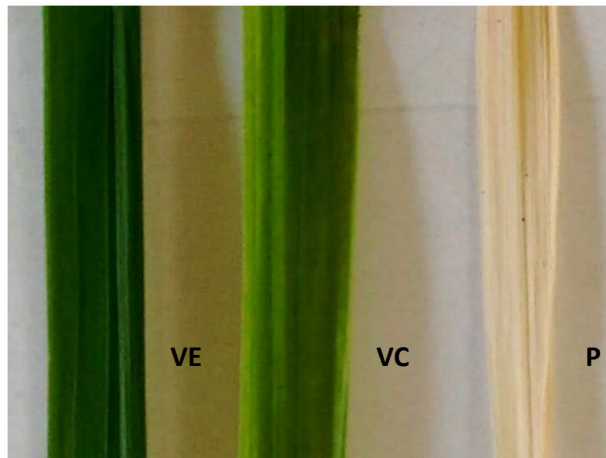
### **3.6- Material vegetal para análise fenotípica**

Para obtenção do material vegetal, foram germinadas sementes da linhagem RNAi-APX4-J e RNAi-APX4-H em papel filtro umedecido com água contendo higromicina 50 µg/µl e sementes não transformadas (Nipponbare) em papel filtro umedecido apenas com água. Aos cinco dias após a emergência, as plântulas foram transferidas para potes com terra preta imersos em água, onde foram cultivados até o final do experimento. Foram plantados oito exemplares de cada uma das linhagens e cultivados em sala de crescimento com fotoperíodo de 14/10 horas de luz/escuro e

temperatura constante de 28 ° C. Os vasos foram posicionados em diferentes bancadas da sala a fim de uniformizar a amostragem. Aos 2 meses de cultivo, as plantas foram suplementadas com uréia ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ), sendo colocado 100 g deste suplemento em cada vaso. O acompanhamento dessas plantas ocorreu durante 5 meses.

### 3.6.1- Análise da coloração foliar

Após a obtenção do material vegetal para análise fenotípica, as plantas foram submetidas a primeira avaliação da coloração foliar, aos 14 dias. O objetivo desta avaliação era analisar em que período as plantas iniciam o processo de envelhecimento foliar. A classificação das folhas foi realizada de acordo com um padrão foliar para folhas verde clara (folhas jovens), verde escuro (folhas maduras) e palha (folhas senescentes), figura 2. As plantas foram observadas até o período de perfilhamento (33 dias). Posteriormente, foi adotado apenas o método de avaliação da entrada dos estádios de desenvolvimento.



**Figura 2.** Padrão de coloração foliar para avaliação da entrada dos estádios e processo de senescência nas plantas RNAiOsAPX4 e NT. **VE-** verde escuro (folhas maduras), **VC-** verde claro (folhas jovens) e **P-** Palha (folhas senescentes).

Juntamente a esta avaliação foram acompanhados o início dos estádios de desenvolvimento entre as plantas Nipponbare e as RNAi, seguindo as normas de Recomendação Técnica de Pesquisa do Sul do Brasil (SOSBAI) indicadas na tabela 1. Foram também medidas as alturas das plantas.

**Tabela1.** Estádios de desenvolvimento do arroz segundo normas de Recomendação Técnica de Pesquisa do Sul do Brasil (SOSBAI, 2014).

Estádios fenológicos da cultura do arroz	
<b>Estádios vegetativos</b>	
	VE Emergência
	V1 Colar formado na primeira folha do colmo principal
	V2 Colar formado na segunda folha do colmo principal
	V3 Colar formado na terceira folha do colmo principal
	V4 Colar formado na quarta folha do colmo principal
	V5 Colar formado na quinta folha do colmo principal
	V6 Colar formado na sexta folha do colmo principal
	V7 Colar formado na sétima folha do colmo principal
	V8 Colar formado na oitava folha do colmo principal
	V9 Colar formado na nona folha do colmo principal
	V10 Colar formado na 10ª folha do colmo principal e faltam três folhas para o surgimento da folha bandeira
	V11 Colar formado na 11ª folha do colmo principal e faltam duas folhas para o surgimento da folha bandeira
<b>Estádios reprodutivos</b>	V12 Colar formado na 12ª folha do colmo principal e falta uma folha para o surgimento da folha bandeira
	V13 Colar formado na 13ª folha (folha bandeira) do colmo principal.
	R0 Iniciação da panícula (evento em um dado momento)
	R1 Diferenciação da panícula (processo através do tempo; diferenciação das ramificações da panícula)
	R2 Formação do colar na folha bandeira
	R3 Exserção da panícula
	R4 Antese (uma ou mais espiguetas)
	R5 Elongação de um ou mais grãos (cariopse) na casca
	R6 Expansão de um ou mais grãos em profundidade
	R7 Ao menos um grão da panícula apresenta casca com coloração típica da cultivar
	R8 Maturidade de um grão isolado (com coloração de casca típica da cultivar)
	R9 Maturidade completa dos grãos na panícula (ponto de colheita)

### 3.6.2- Análise do pólen

Após o início do florescimento (3 meses), as plantas de arroz foram submetidas a avaliação da viabilidade do pólen. Para isso foi utilizada a técnica de coloração por FDA (Fluoresceína de diacetado). De acordo com o protocolo, primeiramente foram coletadas anteras frescas das plantas RNAi e das plantas Nipponbare ao quinto dia do florescimento. Estas anteras foram maceradas em uma solução de sacarose 10% e posteriormente foi adicionado 2µl de solução de FDA sobre elas. A contagem dos grãos foi realizada em microscópio óptico de fluorescência Olympus CXX41, sendo que foram contadas 200 células/ lâmina, entre grãos de pólen viáveis e não viáveis.

Concomitante a esta técnica, foi realizado um experimento de contagem do número de grãos de pólen por antera. Amostrou-se oito anteras de cada uma das linhagens, as quais foram coradas através do método de coloração de Alexander (Alexander,1969). A contagem do número de grãos por antera foi realizada via microscópio óptico de fluorescência Olympus U-TVO 5XC-3.

### 3.6.3- Análise da atividade fotossintética

As três linhagens (RNAiOsAPX4-H, RNAiOsAPX4-J e NT) tiveram sua eficiência efetiva do fotossistema II avaliada, bem como o relativo transporte de elétrons do fotossistema II, essas análises foram mensuradas via fluorímetro de clorofila- OS1p-FL. Este aparelho é composto por uma unidade de controle e uma sonda, a qual contém tanto componentes óticos de excitação quanto de detecção. A fluorescência é excitada por um diodo laser no comprimento de onda de 685 nm. A fluorescência resultante é separada da luz de excitação por um filtro em comprimento de onda >700 nm e é detectada por um fotodiodo PIN. O fluorímetro foi ajustado para efetuar a leitura com fonte de intensidade de 3000  $\mu$ E, durante 5 segundos a 28°C. Os dados coletados pelo aparelho foram: Fo: fluorescência não-variável, Fm: fluorescência máxima, Fv: fluorescência variável, Fv/Fm: rendimento quântico do fotossistema II (PSII),  $\Delta F / Fm' = (Fm' - Fo) / Fm'$ : rendimento quântico efetivo de PSII e ETR: transporte relativo de elétrons do PSII. Foi realizada uma amostragem de cinco minutos em cada uma das 8 plantas de cada genótipo.

Por meio do aparelho Minolta SPAD- 502®, que utiliza um método não destrutivo, rápido e simples, foi possível a obtenção de valores indiretos do teor de clorofila presente nas folhas bandeira. Este aparelho apresenta dois diodos que emitem luz azul (400-500 nm) e luz infravermelha (940nm). A luz vermelha situa-se próxima dos dois comprimentos primários de onda associados a atividade da clorofila (645 e 663 nm). O comprimento de onda infravermelho serve como referência interna para compensar diferenças nas espessuras ou conteúdo de água da folha. A luz que passa através da folha é captada pelo receptor que a converte em sinais digitais por meio de um conversor A/D. Os sinais digitais são usados por um microprocessador para calcular o valor em unidade SPAD. Três medições foram feitas a cada folha avaliada, em uma condição de 28 °C. De cada planta foram coletados dados de apenas uma folha, totalizando uma medida de 8 folhas, as quais correspondiam as 8 plantas de cada genótipo.

### **3.6.4- Quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Dado o início da floração, foi mensurada a quantidade de peróxido de hidrogênio presente nas folhas bandeiras das plantas OsRNAiApX4 e NT. Essa medição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizada de acordo com o método previamente descrito (RAO et al., 2000). Utilizou-se como método de oxidação Amplifu® Red (Sigma-Aldrich), como anteriormente descrito (SMITH et al., 2004). Após o preparo de todas as soluções, uma alíquota da solução estoque do reagente Bradford-Sigma-Aldrich foi diluído em 5x. Em poços individuais de uma microplaca de Elisa, foram pipetadas 195 µl desse reagente, 1 µl de Amplex® Red reagent/HRP, 1 µl de tampão de extração e 1 µl de peroxidase p8375- Sigma-Aldrich por poço numa concentração 2 µM. Em seguida foram adicionados 5 µl de amostra e de BSA em concentrações crescentes e conhecidas para fazer a curva padrão. As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e analisadas no espectrofotômetro Spectro Max M4, na excitação e emissão dos comprimentos de onda de 563 nm (5 nm) e 587 nm (5 nm), respectivamente.

### **3.6.5- Análise da produção**

Para estimar o rendimento médio de grãos dos genótipos em estudo, foi realizada pesagem de todos os grãos de 8 plantas de cada linhagem. Para esse procedimento foi utilizada uma balança SAE-200, onde as sementes foram colocadas em tubos Falcons e em seguida pesadas. A partir dos resultados obtidos, foi calculado o rendimento médio de grãos (g) por genótipo.

### **3.7- Senescência induzida**

Para realização do experimento de senescência induzida foram utilizadas plantas de dois meses (estádio V8-V11) de idade. As folhas amostradas foram cortadas em pedaços de 5 cm e colocadas em placas de Petri. Foram montadas 14 placas de cada tratamento, sendo 7 submetidas à condição de claro e 7 a condição de escuro. Os tratamentos utilizados foram: 25 µM ácido abscísico (ABA 25) (indutor) diluído em 3 mM pH 5.8 de morfolino etanossulfônico (MES) (tampão), 50 µM de ABA



dissolvido em MES, 50 µl de 6-benziladenina- BAP (inibidor) igualmente dissolvido em MES. Como controle, foram montadas placas apenas com MES. As linhagens utilizadas nesse experimento foram: RNAi-APX1/2, APX4\_J, APX4-H, APX7\_(L8), APX8\_(L7), APX7/8 e Nipponbare. As plantas tiveram uma exposição de sete dias aos tratamentos. Nesse período foi avaliada a mudança de coloração foliar entre os genótipos.

### **3.8- Análise estatística**

Os dados foram plotados com GRAPHPAD PRISM 5.0 (Software GraphPad Inc., La Jolla, CA, EUA) e analisadas por teste t-Student pareado. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

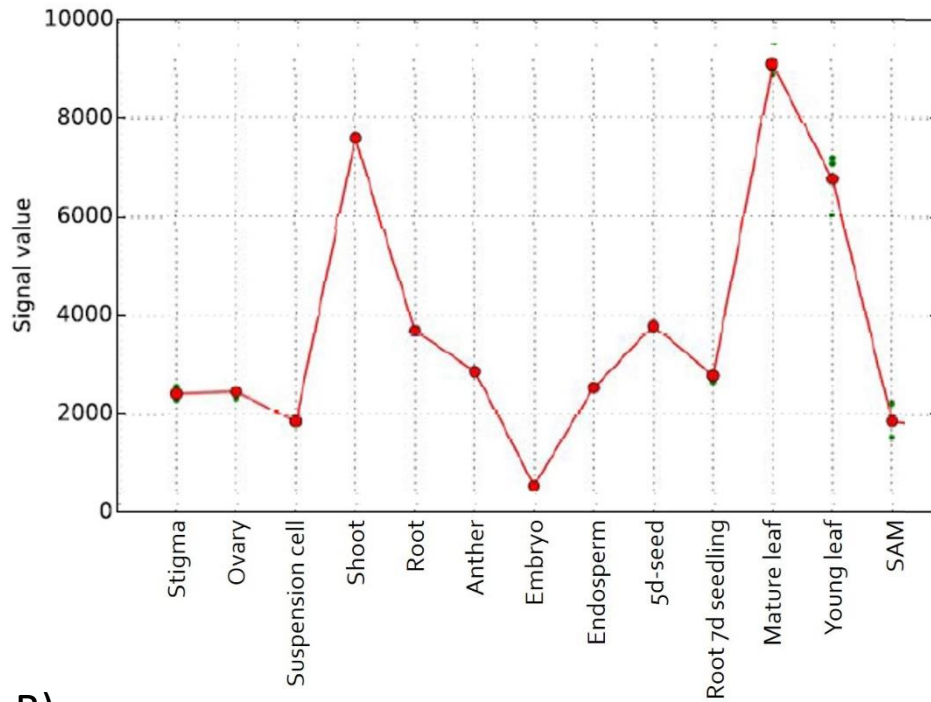
## **4.0- RESULTADOS**

### **4.1- Caracterização Molecular**

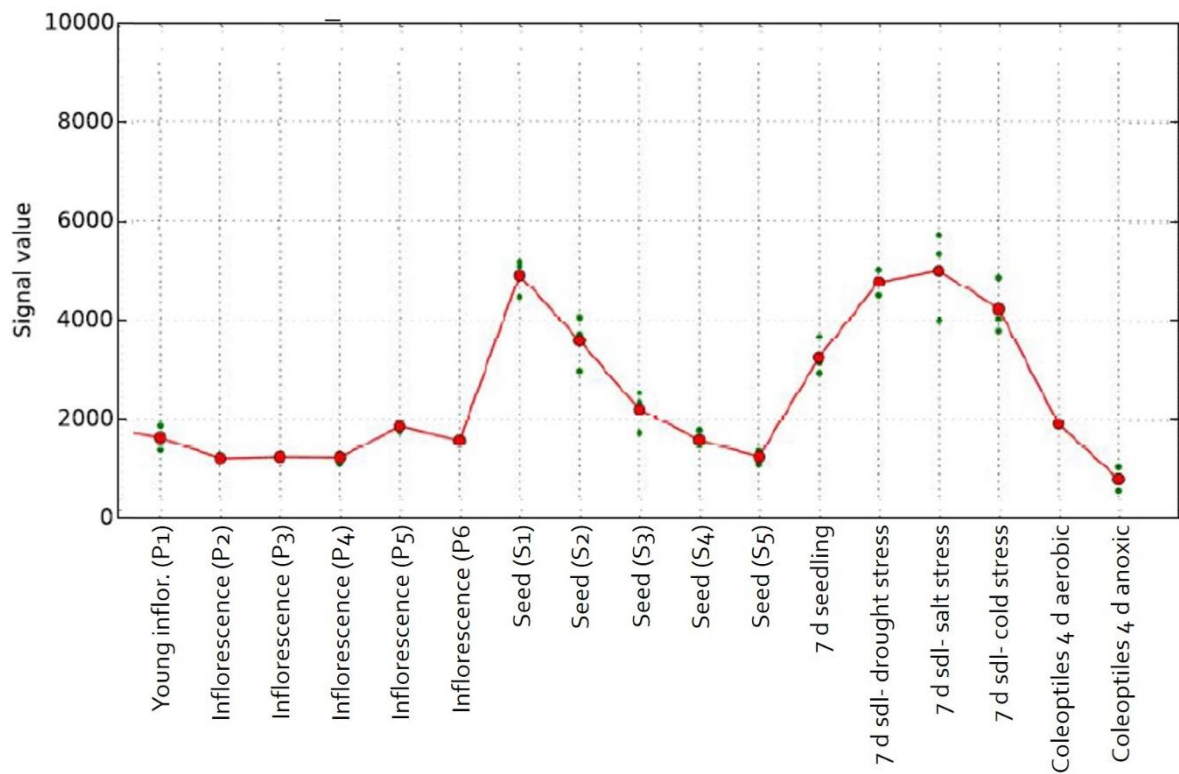
#### **4.1.1- Análises *in silico* da expressão gênica de OsAPX4**

A análise de dados de expressão disponíveis em bancos de dados públicos permitiu observar que a expressão de OsAPX4 pode ser detectada nos diferentes tecidos amostrados, mas a maior expressão é encontrada na parte aérea de plântulas jovens e, principalmente, em folhas maduras (Figura 3A). Além disso, a expressão de OsAPX4 é induzida no primeiro estágio do desenvolvimento da semente e também em plântulas de sete dias submetidas aos estresses de seca e salino (Figura 3B).

A)



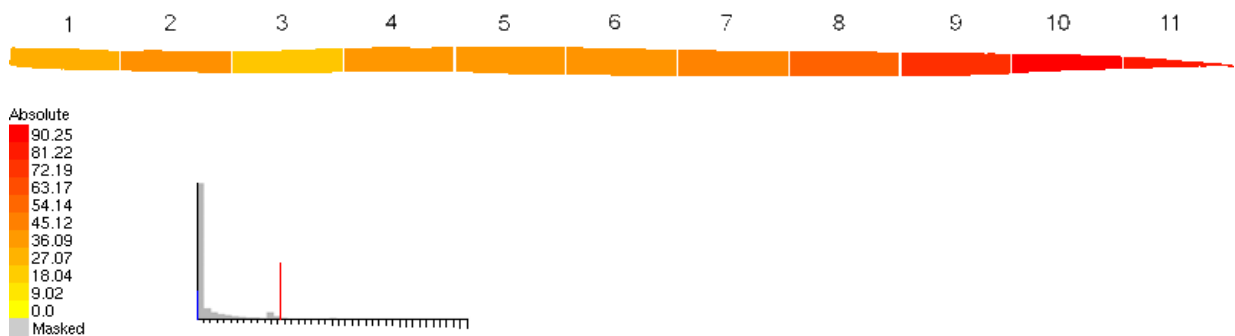
B)



**Figura 3.** Perfil de expressão *in silico* de OsAPX4 em diferentes tecidos e fases de desenvolvimento do arroz. A) Expressão de OsAPX4 em diferentes órgãos vegetais. B) Expressão de OsAPX4 em diferentes fases do desenvolvimento da inflorescência

e da semente e em plântulas submetidas a estresses abióticos. Os pontos vermelhos representam a média da expressão e os pontos verdes representam os valores de expressão de cada experimento de microarranjo ou RNAseq depositados na plataforma online PlaNet (<http://www.gene2function.de/>).

Para determinar o perfil da expressão de *OsAPX4* ao longo da folha de arroz, foi realizada análise *in silico* com a ferramenta Rice eFP browser da plataforma online BAR (<http://bar.utoronto.ca/efprice/cgi-bin/efpWeb.cgi>). O resultado indica que a expressão do gene pode ser detectada ao longo de toda a folha, mas a maior expressão de *OsAPX4* ocorre no ápice foliar (Figura 4).

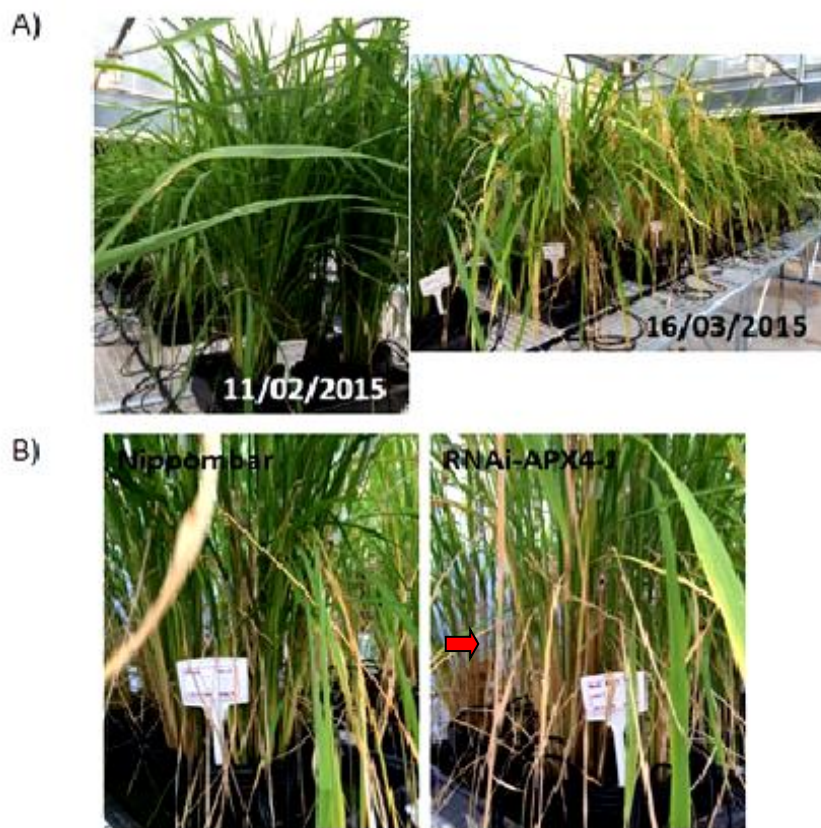


**Figura 4.** Pictografia de fluorescência eletrônica da expressão de *OsAPX4* (LOC\_Os08g43560) em segmentos de folhas de arroz. A imagem de eFP representa dados de microarranjo normalizados pelo método de RPKM. A linha vermelha do gráfico representa o valor máximo de expressão da sonda de *OsAPX4* e a escala de cores (amarelo = 0; vermelho = maior expressão) representa o gradiente de expressão do valor máximo. A imagem foi gerada baseada nos dados de (WANG et al., 2014), depositados no Rice eFP Browser.

#### 4.1.2- Sequenciamento em larga escala de plantas RNAi*OsAPX4*

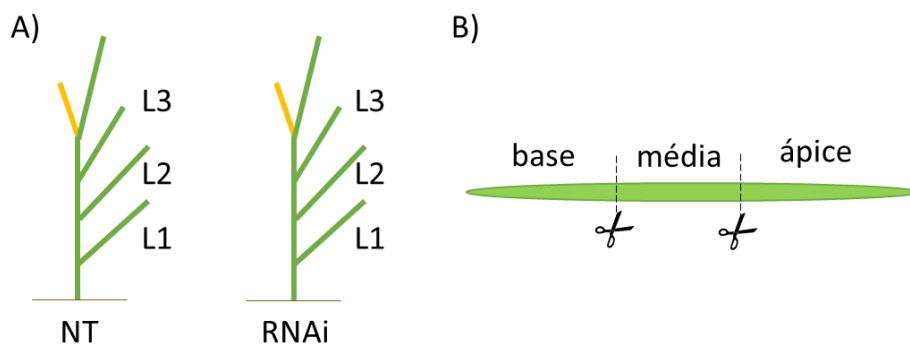
Plantas silenciadas para o gene *OsAPX4* foram produzidas por Ribeiro et al. (2012) por RNA de interferência (RNAi). Para investigar a função molecular de *OsAPX4*, um experimento de sequenciamento por RNAseq foi conduzido para comparar o transcrito de plantas RNAi*OsAPX4* ao de plantas não transformadas (NT).

Para a obtenção do material de estudo, plantas de arroz NT e duas linhagens RNAiOsAPX4 (G e J), silenciadas para o gene *OsAPX4*, foram crescidas e cultivadas entre os meses de dezembro de 2014 a abril de 2015. As condições de crescimento em casa de vegetação propiciaram o crescimento vigoroso das plantas de todas as linhagens, independente do genótipo (Figura 5A). Após quatro meses de cultivo, todas as plantas de arroz começaram a apresentar folhas senescentes. Entretanto, por uma inspeção visual verificou-se que as plantas RNAiOsAPX4 apresentavam maior número de folhas senescentes e amarelamento precoce em relação às plantas não transformadas (Figura 5B), confirmando o fenótipo esperado, que foi observado anteriormente por Ribeiro e colaboradores (2012).

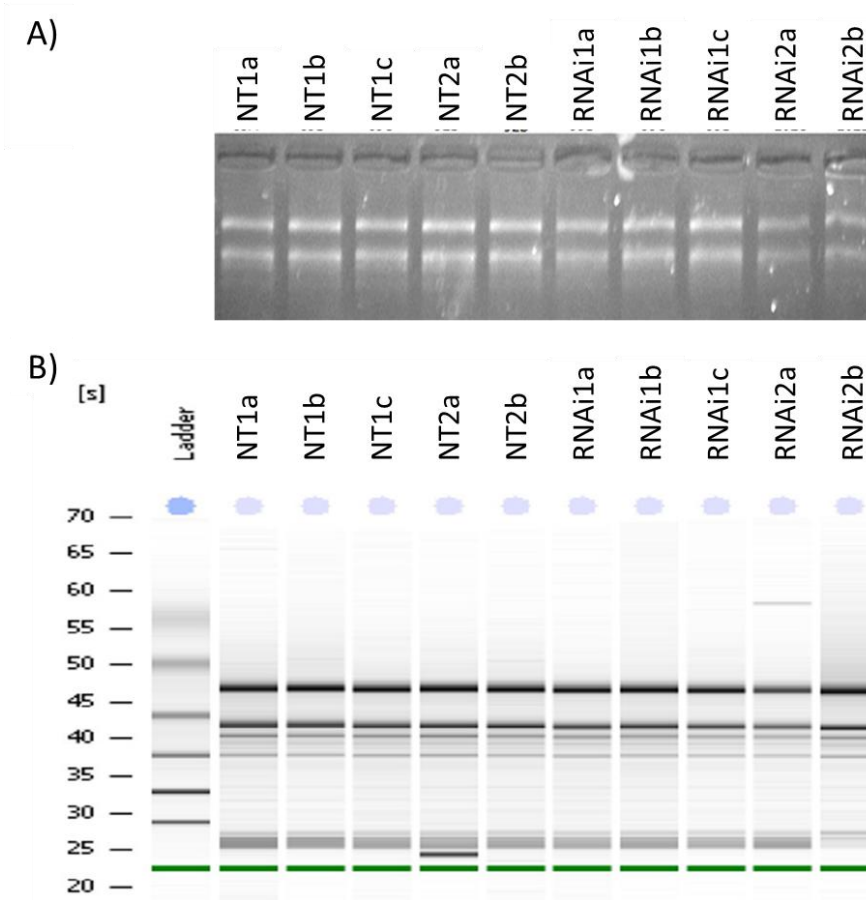


**Figura 5:** Registros fotográficos representativo do cultivo de arroz em casa de vegetação. A) Plantas de arroz com dois meses de plantio, apresentando um fenótipo de crescimento vigoroso. B) Plantas NT e RNAiOsAPX4-J, com três meses de idade. Nesta imagem é possível perceber sinais de senescência induzida por idade, evidenciando a senescência avançada em plantas RNAi:APX4-J (seta vermelha).

No início de abril foram coletadas 24 amostras de folhas de plantas, 8 de cada genótipo (RNAiOsAPX4-J, RNAiOsAPX4-H e NT) em estágio R9. Para realizar a comparação entre folhas de diferentes idades, foram amostradas as folhas L1, L2 e L3, representando uma folha mais velha, uma intermediária e uma mais jovem, respectivamente. Cada folha foi ainda segmentada em parte basal, média e apical antes do congelamento (Figura 6). Após a extração de RNA, constatou-se que muitas amostras apresentavam qualidade insuficiente para a realização do RNAseq. Essas amostras apresentavam características de degradação, tais como “arraste” em gel de agarose e relação da absorbância a 260 nm e 280 nm ( $A_{260}/280$ ) inferior a 1,80. Além disso, a quantidade de RNA total obtida das extrações da maioria das amostras de ápices foliares foi insuficiente para o envio do material para sequenciamento. Como resultado, foram selecionadas para o experimento de sequenciamento amostras que estavam em triplicata ou duplicata biológica, da parte média de folhas L1 e L2 de plantas NT e RNAiOsAPX4\_J. No total, 10 amostras foram utilizadas para a realização do RNAseq, pois atingiram os requisitos de quantidade e qualidade esperados, tais como ausência de degradação e escore de integridade do RNA (RIN) superior a sete (Figura 7 e Tabela 2).



**Figura 6.** Desenho esquemático da metodologia de amostragem. A) As folhas L1, L2 e L3 de um planta de arroz no estágio R9 de cada genótipo foram coletadas, em quadruplicata. B) Cada folha amostrada foi segmentada em parte basal, média e apical.



**Figura 7.** Seleção de amostras de RNA de folhas L1 e L2 de plantas NT e RNAiOsAPX4 que foram utilizadas para a construção das bibliotecas de sequenciamento. A) Eletroforese em gel de agarose das amostras de RNA selecionadas. B) Eletroforese em gel em um Nano Chip, com o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer, das amostras recebidas para sequenciamento. As abreviações NT1 e NT2 representam a folha L1 e L2 de uma planta não-transformada, respectivamente. RNAi1 e RNAi2 representam a folha L1 e L2 de uma planta RNAiOsAPX4\_J, respectivamente. As letras minúsculas indicam as triplicatas ou duplicatas biológicas.

**Tabela 2.** Quantificação e resultado da análise qualitativa realizada com o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer.

Amostra Bioanalyzer	Amostra original	Material *	Genótipo	[ng/ $\mu$ l]	OD 260/280 nm	Volume ( $\mu$ l)	RIN score (Bioanalyzer)
NT1a	89A	Folha L1	NT	74	1,95	50	7.50
NT1b	89B	Folha L1	NT	127	1,99	50	7.60
NT1c	89C	Folha L1	NT	88	1,98	50	7.60
NT2a	92B	Folha L2	NT	134	1,98	50	7.40
NT2b	92D	Folha L2	NT	101	1,93	50	7.60
RNAi1a	99B	Folha L1	RNAi- APX4_J	81	1,8	50	7.60
RNAi1b	99C	Folha L1	RNAi- APX4_J	85	1,9	50	7.60
RNAi1c	99D	Folha L1	RNAi- APX4_J	106	1,87	50	7.80
RNAi2a	102C	Folha L2	RNAi- APX4_J	52	1,97	50	7.70
RNAi2b	102D	Folha L2	RNAi- APX4_J	90	1,98	50	7.40

\*Parte média de folhas de plantas em estágio R9 de desenvolvimento.

O sequenciamento foi realizado em um equipamento Illumina HiSeq 2500 V4 e resultou em um total de 571.593.590 sequências de alta qualidade, conforme descrito na Tabela 3. As sequências geradas foram primeiramente inspecionadas e depois processadas para eliminar regiões com baixa qualidade de sequenciamento. Após a limpeza, as sequências resultantes foram mapeadas no genoma de arroz.

**Tabela 3.** Relatório de qualidade das bibliotecas de sequenciamento Illumina gerados pelo software FastQC.

Código da biblioteca	Nome do arquivo	Total de sequências	Tamanho da sequência (nt)	% GC	Phred score (2500000+ seqs)
89AS53	89A_S53_L005_R1_001.fastq.gz	32404737	101	49	> 35
	89A_S53_L005_R2_001.fastq.gz	32404737	101	50	> 35
89BS54	89B_S54_L005_R1_001.fastq.gz	29081365	101	49	> 35
	89B_S54_L005_R2_001.fastq.gz	29081365	101	50	> 35
89CS55	89C_S55_L005_R1_001.fastq.gz	27803748	101	49	> 35
	89C_S55_L005_R2_001.fastq.gz	27803748	101	50	> 35
92BS56	92B_S56_L005_R1_001.fastq.gz	26786737	101	49	> 35
	92B_S56_L005_R2_001.fastq.gz	26786737	101	49	> 35
92DS57	92D_S57_L005_R1_001.fastq.gz	27272054	101	49	> 35
	92D_S57_L005_R2_001.fastq.gz	27272054	101	49	> 35
99BS58	99B_S58_L005_R1_001.fastq.gz	29331019	101	49	> 35
	99B_S58_L005_R2_001.fastq.gz	29331019	101	49	> 35
99CS59	99C_S59_L005_R1_001.fastq.gz	29500673	101	49	> 35
	99C_S59_L005_R2_001.fastq.gz	29500673	101	49	> 35
99DS60	99D_S60_L005_R1_001.fastq.gz	30458096	101	49	> 35
	99D_S60_L005_R2_001.fastq.gz	30458096	101	49	> 35
102CS61	102C_S61_L005_R1_001.fastq.gz	27117826	101	50	> 35
	102C_S61_L005_R2_001.fastq.gz	27117826	101	50	> 35
102DS62	102D_S62_L005_R1_001.fastq.gz	26040540	101	49	> 35
	102D_S62_L005_R2_001.fastq.gz	26040540	101	50	> 35

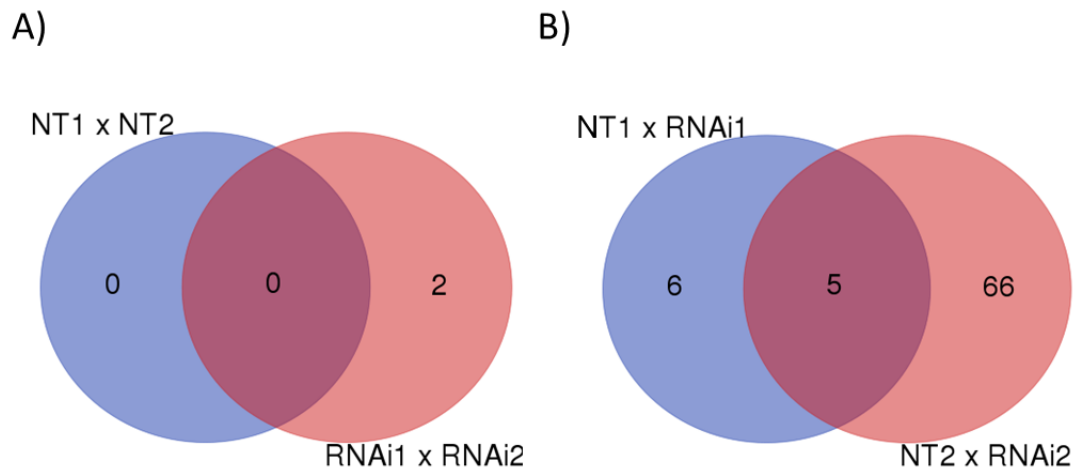
A identificação da expressão diferencial de genes entre as bibliotecas sequenciadas foi realizada através de análises estatísticas do pacote DESeq2. Foram considerados como genes diferencialmente expressos aqueles que apresentaram uma variação de expressão com “fold-change” maior ou igual a dois e um p-valor ajustado menor que 0,05. De acordo com estes critérios, não foram observados genes diferencialmente expressos entre as folhas L1 e L2 de plantas NT, indicando que a expressão de genes nestas folhas não é influenciada pela diferença de maturidade entre elas (Figura 8A). Por outro lado, a comparação entre as folhas L1 e L2 de plantas RNAiOsAPX4 indicou a alteração da expressão de dois genes, OS11G0587600 e OS11G0530600. O primeiro gene codifica uma proteína do tipo transportador ABC (ABCG48) e é mais expresso em folhas L1, enquanto que o segundo gene codifica uma enzima chalcona sintase (CHS1) e é mais expresso em folhas L2.

A comparação da expressão de genes entre as folhas L1 de plantas NT e RNAiOsAPX4 resultou na identificação de um pequeno grupo de 11 genes com



expressão diferencial (Figura 8B). Neste grupo, foi detectada a menor expressão do gene *OsAPX4* em folhas de plantas RNAi (fold-change de 6,2), bem como a expressão diferencial de sete genes que correspondem a proteínas hipotéticas e 3 genes que foram descritos como similares a proteínas de função conhecida. A maior variabilidade de expressão gênica foi encontrada na comparação entre folhas L2 de plantas NT e RNAi*OsAPX4*, onde detectou-se 71 genes diferencialmente expressos (Figura 8B). Dentre estes, 4 transcritos não codificam proteínas e não foram considerados nas descrições seguintes. A Tabela 4 reúne as informações referentes aos 66 genes codificadores de proteínas diferencialmente expressos em folhas L2 de RNAi*OsAPX4*. Destes genes, 25 apresentaram maior expressão, enquanto que 42 genes apresentaram menor expressão nas plantas RNAi*OsAPX4* em relação às plantas NT.

Embora não seja possível atribuir uma função específica a cerca de um quarto dos genes, pode-se associar os outros genes a 13 diferentes categorias de processos biológicos (Tabela 4). Os processos biológicos mais representados são resposta a estresse oxidativo, metabolismo de aminoácidos e nitrogênio, fosforilação de proteínas, transporte e respostas de defesa. Coerentemente, observou-se maior representação de genes com função molecular de oxidoreductase, cinase e proteína transportadora, além de diversas enzimas que juntas correspondem a cerca de 24 % dos genes identificados (Tabela 4). Todos os genes com função de cinase e os genes relacionados com respostas de defesa apresentaram menor expressão nas folhas L2 de RNAi*OsAPX4* do que em folhas L2 de NT. Além disso, também apresentaram menor expressão em RNAi*OsAPX4* os genes categorizados como envolvidos no metabolismo de lipídios, no metabolismo de proteínas e o único gene envolvido na proliferação celular, indicando que o silenciamento de *OsAPX4* desencadeou uma reprogramação celular de genes relacionados com o metabolismo energético nas folhas L2. Em relação à categoria de regulação da transcrição, foram detectados três possíveis fatores de transcrição, sendo que OS05G0322900 e OS08G0428200 apresentaram menor expressão e OS08G0357300 está mais expresso em folhas L2 de RNAi*OsAPX4*. Também foram detectados dois genes relacionados ao florescimento, cuja expressão foi maior em folhas L2 de RNAi*OsAPX4*.



**Figura 8.** Diagrama de Venn com o número de genes com expressão diferencial entre as amostras (*fold-change*  $\geq 2$ ). A) Genes diferencialmente expressos na comparação entre as folhas L1 e L2 de um mesmo genótipo. B) Comparação dos genes diferencialmente expressos nas folhas L1 e L2 entre os genótipos. As abreviações NT1 e NT2 representam a folha L1 e L2 de uma planta não-transformada, respectivamente; RNAi1 e RNAi2 representam a folha L1 e L2 de uma planta RNAiOsAPX4\_J, respectivamente.

**Tabela 4.** Lista de genes diferencialmente expressos em folhas L2 de plantas RNAiOsAPX4 em relação as plantas não-transformadas.

Categoria funcional	ID RAP	ID MSU	Descrição	Cod*	Fold Change	p-value ajustado
Resposta a estresse oxidativo	OS10G0456100	LOC_Os10g31780.1	oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family domain containing protein, expressed	-	2.1	2.34E-03
	OS08G0249900	LOC_Os08g15149.1	oxidoreductase, 2OG-Fe oxygenase family protein, expressed/ Similar to Gibberellin 20 oxidase 2. (Os08t0249900-00)		2.0	3.27E-03
	OS01G0835500	LOC_Os01g61880.1	respiratory burst oxidase, putative, expressed (NADPH oxidase)		2.0	2.30E-03
	OS01G0591300	LOC_Os01g40870.1	aldehyde dehydrogenase, putative, expressed		-2.0	2.20E-05
	OS09G0438000	LOC_Os09g26660.1	ferric reductase, putative, expressed		-2.0	3.36E-05
	OS08G0453733	LOC_Os08g35210.1	ferric reductase, putative, expressed		-2.6	3.73E-05
	OS08G0549100	LOC_Os08g43560.1	OsAPx4 - Peroxisomal Ascorbate Peroxidase encoding gene 5,8,9, expressed		-7.5	8.07E-93
Regulação da transcrição	OS08G0357300	LOC_Os08g26880.1	bZIP transcription factor domain containing protein, expressed	-	2.0	7.82E-03
	OS08G0428200	LOC_Os08g33150.1	MYB family transcription factor, putative, expressed		-2.1	4.88E-03
	OS05G0322900	LOC_Os05g25770.1	WRKY45, expressed		-2.2	1.20E-09
Fosforilação de proteínas	OS05G0261700	LOC_Os05g17604.1	SHR5-receptor-like kinase, putative, expressed	-	-2.2	3.28E-03
	OS02G0227700	LOC_Os02g13430.1	receptor-like protein kinase 5 precursor, putative, expressed		-2.2	2.42E-04
	OS04G0370900	LOC_Os04g30240.1	OsWAK60 - OsWAK receptor-like protein kinase, expressed		-2.2	4.81E-08
	OS04G0307500	LOC_Os04g24220.1	OsWAK32 - OsWAK receptor-like protein kinase, expressed		-2.7	7.98E-09
	OS02G0615500	LOC_Os02g40200.1	receptor-like protein kinase precursor, putative, expressed		-3.0	2.46E-07
	OS11G0669200	LOC_Os11g44690.1	cysteine-rich receptor-like protein kinase 19 precursor, putative, expressed		-6.2	1.01E-21

Metabolismo de hormônios	OS07G0111900	LOC_Os07g02120.1	flavin-containing monooxygenase family protein, putative, expressed	2.2	2.48E-03
	OS06G0691400	LOC_Os06g47620.1	IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 6 precursor (EC 3.5.1.-) [ILL6] [LOC_Os06g47620] [OsJ_22451] [P0532H03.15]	2.0	5.67E-03
	OS09G0457100	LOC_Os09g28390.1	Abscisic acid 8'-hydroxylase 3 (EC 1.14.13.93) (ABA 8'-hydroxylase 3) (Cytochrome P450 707A7) (OsABA8ox3) [CYP707A7] [ABA8OX3] [LOC_Os09g28390] [B1342C04.43] [OsJ_028469]	-2.2	2.86E-03
Metabolismo de lipídios	OS01G0291500	LOC_Os01g18744.1	Acyl transferase 4/transferase family protein, putative, expressed	-2.2	3.42E-03
	OS01G0850550	LOC_Os01g63180.1	Laccase-6 precursor (EC 1.10.3.2) (Benzenediol:oxygen oxidoreductase 6) (Diphenol oxidase 6) (Urishiol oxidase 6) [LAC6] [LOC_Os01g63180] [OsJ_003986] [P0529H11.21]	-3.7	3.72E-10
	OS05G0278500	LOC_Os05g19910.1	transferase family protein, putative, expressed	-4.1	1.30E-21
Metabolismo de amino ácidos e nitrogênio	OS05G0430800	LOC_Os05g35580.1	amidophosphoribosyltransferase, chloroplast precursor, putative, expressed	2.2	1.39E-03
	OS07G0694600	LOC_Os07g49390.1	Arogenate dehydratase/ P-protein, putative, expressed	2.1	2.45E-05
	OS08G0468100	LOC_Os08g36480.1	Nitrate reductase [NADH] 1/ nitrate reductase, putative, expressed	2.1	7.87E-07
	OS10G0523700	LOC_Os10g37980.1	prephenate dehydratase domain containing protein, expressed	2.0	3.25E-03
	OS03G0221200	LOC_Os03g12110.1	homocysteine S-methyltransferase protein, putative, expressed	-2.0	1.38E-02
	OS03G0718000	LOC_Os03g50880.1	Anthranilate synthase beta subunit 2, chloroplastic precursor (EC 4.1.3.27) (OsASB2) (Anthranilate synthase, glutamine amidotransferase component 2-2) [ASB2] [OASB2] [LOC_Os03g50880] [OsJ_12361]	-2.1	3.55E-06
	OS04G0640600	LOC_Os04g54800.1	shikimate kinase, putative, expressed	-2.4	9.06E-05
Metabolismo de carb	OS03G0255100	LOC_Os03g15020.1	Beta-galactosidase 6 precursor (EC 3.2.1.23) (Lactase 6) [LOC_Os03g15020]	-2.1	1.03E-03

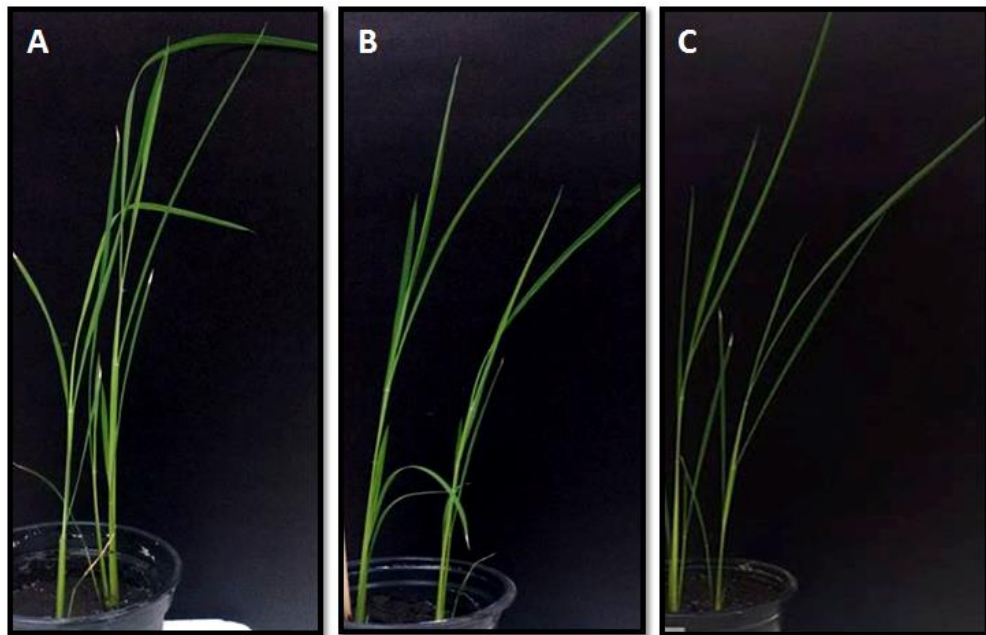
Resposta a estresses	OS07G0529600	LOC_Os07g34570.1	Thiamine thiazole synthase, chloroplastic/ FAD dependent oxidoreductase domain containing protein, expressed		2.2	2.24E-05
	OS10G0531400	LOC_Os10g38780.1	Glutathione S-transferase GSTU6, putative, expressed		-2.1	1.26E-05
	OS06G0661800	LOC_Os06g45100.1	Cryptochrome DASH, chloroplastic/mitochondrial precursor [CRYD] [LOC_Os06g45100] [OSJNBa0051O02.40] [OSJNBb0065C04.7]		-2.2	2.83E-06
Metabolismo de proteínas	OS04G0538100	LOC_Os04g45490.1	elongation factor, putative, expressed		-2.2	1.24E-14
	OS10G0521500	LOC_Os10g37720.1	hydrolase, alpha/beta fold family protein, putative, expressed		-2.2	1.57E-04
	OS04G0538166	LOC_Os04g45490.1	elongation factor, putative, expressed		-2.3	4.50E-12
	OS07G0532800	LOC_Os07g34850.1	aspartic proteinase nepenthesin, putative, expressed		-2.5	2.08E-04
Transporte	OS04G0422300	LOC_Os04g34490.1	Protein of unknown function DUF6, transmembrane domain containing protein. (Os04t0422300-01)		7.3	1.35E-25
	OS06G0250600	LOC_Os06g14030.1	Potassium channel KOR1 (K(+)) outward-rectifying channel 1 [LOC_Os06g14030] [OSJNBa0091G06.35] [P0431E05.11]		2.0	1.25E-03
	OS03G0411300	LOC_Os03g29770.1	EF hand family protein, expressed		2.0	9.78E-03
	OS03G0626700	LOC_Os03g42830.1	MATE efflux family protein, putative, expressed		-2.1	1.78E-06
	OS06G0671000	LOC_Os06g45940.1	Probable potassium transporter 13 (OsHAK13) [HAK13] [LOC_Os06g45940] [OSJNBa0032M14.1] [P0485A07.11]		-2.5	2.09E-04
	OS03G0838400	LOC_Os03g62200.1	Ammonium transporter 3 member 2 (OsAMT3;2) [AMT3-2] [LOC_Os03g62200] [OsJ_13291] [OSJNBa0042I09.15]		-3.0	6.05E-07
Proliferação celular	OS07G0124100	LOC_Os07g03200.1	PSK4/ phytosulfokines precursor, putative, expressed		-2.2	1.63E-05

Florescimento	OS07G0671000	LOC_Os07g47450.1	Flowering-promoting factor 1-like protein 5 (FPF1-like protein 5) [LOC_Os07g47450] [OsJ_25526] [P0470D12.115]		2.2	2.32E-04
	OS09G0513500	LOC_Os09g33850.1	osFTL4 FT-Like4 homologous to Flowering Locus T gene; contains Pfam profile PF01161: Phosphatidylethanolamine-binding protein, expressed		2.0	1.19E-02
Respostas de defesa	OS01G0731100	LOC_Os01g53090.1	pathogen-related protein, putative, expressed		2.1	6.52E-03
	OS12G0555000	LOC_Os12g36830.1	RSOsPR10/ pathogenesis-related Bet v I family protein, putative, expressed		-2.0	1.28E-02
	OS12G0555200	LOC_Os12g36850.1	pathogenesis-related Bet v I family protein, putative, expressed		-2.1	4.08E-03
	OS05G0427400	LOC_Os05g35290.1	phenylalanine ammonia-lyase, putative, expressed		-2.6	3.93E-05
	OS11G0116300	LOC_Os11g02440.1	chalcone--flavonone isomerase, putative, expressed		-3.8	3.23E-12
	OS02G0627100	LOC_Os02g41680.1	Phenylalanine ammonia-lyase (EC 4.3.1.24) [ZB8] [LOC_Os02g41680] [OsJ_007359] [P0042D01.10]		-4.5	1.87E-15
Sem classificação	OS07G0184633	LOC_Os07g08680.1	expressed protein		6.0	1.19E-19
	OS01G0932550	None	NA		4.5	1.88E-13
	OS06G0685400	None	NA		3.3	4.10E-08
	OS01G0845950	LOC_Os01g62740.1	expressed protein		2.9	1.78E-06
	OS04G0606601	None	NA		2.7	1.60E-05
	OS06G0273400	None	NA		2.2	4.51E-05
	OS07G0543700	None	NA		2.2	2.42E-04
	OS07G0516300	LOC_Os07g33270.1	DUF584 domain containing protein, putative, expressed		2.1	1.57E-04
	OS01G0186600	LOC_Os01g09190.1	expressed protein		-2.0	1.04E-02
	OS11G0600600	LOC_Os11g38790.1	expressed protein		-2.1	8.00E-03
	OS07G0642100	LOC_Os07g44770.1	expressed protein		-2.2	3.73E-05
	OS06G0185400	LOC_Os06g08620.1	expressed protein		-2.5	2.32E-04
	OS08G0157550	None	NA		-2.7	2.68E-05
	OS04G0468600	LOC_Os04g39320.1	expressed protein		-3.1	1.33E-11
OS02G0552700	LOC_Os02g34760.1	NA		-4.8	1.13E-17	
Cod*: representação colorida de genes com maior expressão (vermelho) e menor expressão (azul).						

## 4.2- Caracterização Fenotípica

### 4.2.1- Análise da coloração foliar

Em um estudo anterior foi verificado que o silenciamento de *OsAPX4* leva ao desenvolvimento de senescência precoce em plantas de arroz (RIBEIRO et al., 2012). No presente trabalho, duas linhagens de plantas RNAi*OsAPX4* foram caracterizadas fenotipicamente de maneira detalhada através dos métodos visuais de classificação da coloração foliar e avaliação da entrada dos estádios de desenvolvimento. Aos 21 dias (estádio V4), observou-se que as plantas RNAi*OsAPX4J* já apresentavam um maior número de folhas com ápices senescentes em relação as plantas não transformadas (NT) (Fig. 9)



**Figura 9.** Análise foliar do estágio V4. A figura A representa as plantas da linhagem RNAi*OsAPx4-J*, B representa as plantas da linhagem RNAi*OsAPx4-H* e C as plantas NT (não transformadas). Todas as linhagens encontravam-se na coloração foliar VE (verde escuro). Embora existisse esse padrão, é possível observar, em A, um maior número de ápices senescentes em relação as demais folhas das outras imagens.

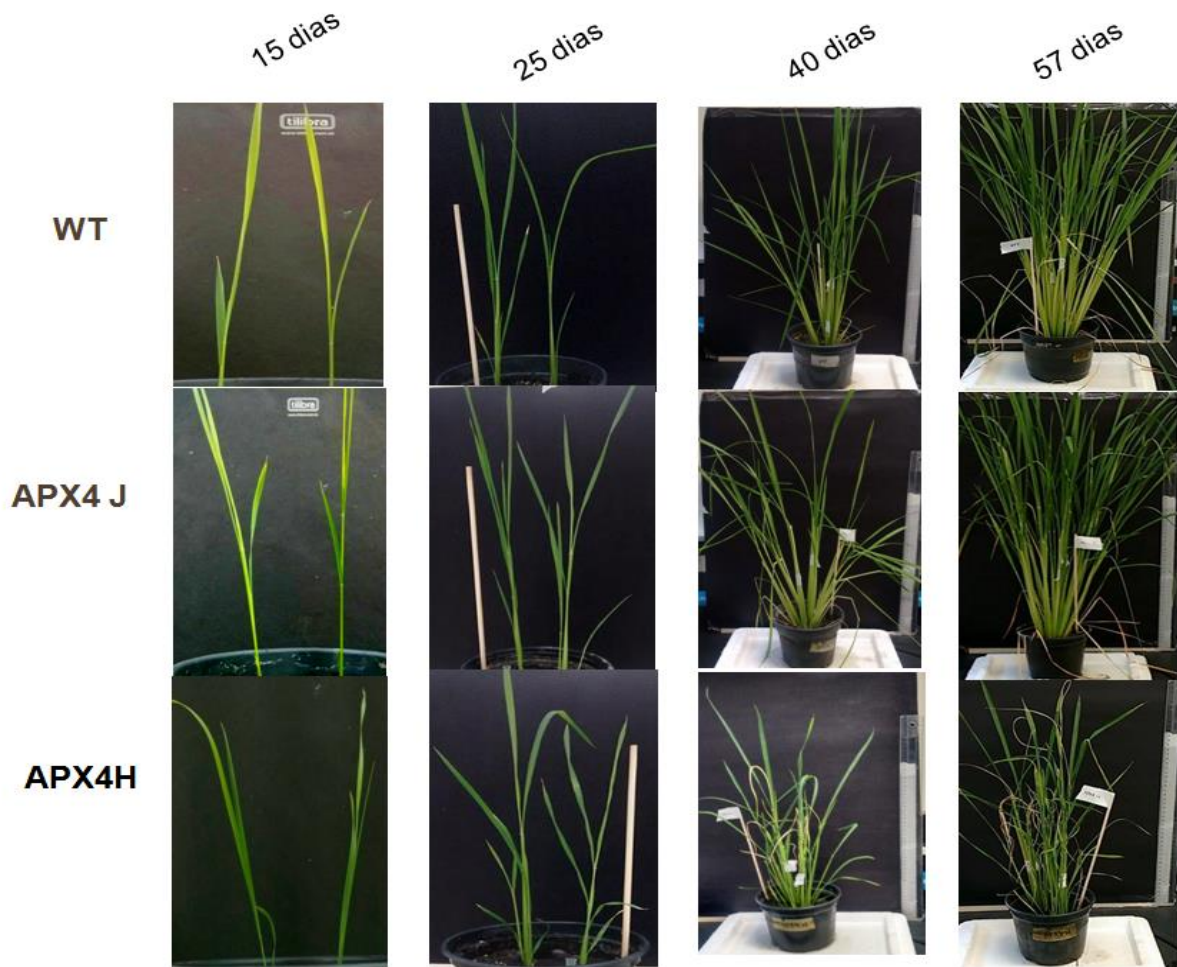
A partir de V4, as plantas entraram em processo de perfilhamento. Por isso, a avaliação da entrada nos estádios de desenvolvimento entre as três linhagens foi realizada apenas com o colmo principal. Além disso, a classificação da coloração foliar

passou a ser realizada para a planta inteira, e não mais em folhas individuais. Com a identificação do colmo principal, realizou-se então a contagem das folhas para classificação de estádios vegetativos de 3 em 3 dias, de baixo para cima, iniciando-se sempre pela folha um (Tabela 5). Aos 40 dias tornou-se nítida a diferença entre os genótipos, evidenciando o maior número de folhas senescentes nas linhagens RNAiOsAPX4 em relação a NT (Fig. 10).

**Tabela 5.** Acompanhamento dos estádios de desenvolvimento das linhagens RNAiOsAPX4 e NT. Nesta tabela estão descritos o avanço dos estádios de desenvolvimento correspondentes aos números de dias após o plantio, sendo que os valores aproximados corresponde a aproximação do estágio de desenvolvimento. A análise foi realizada por meio da identificação e contagem de folhas do colmo principal.

DATA	GENÓTIPO	ESTÁDIO VEGETATIVO (V)			
		VASO 1	VASO 2	VASO 3	VASO 4
12 DIAS	NT	6,8	7,5	6,8	7,8
	APX4 J	7,5	8,3	7,8	7,6
	APX4 H	6,4	6,8	8,5	5,6
27 DIAS	NT	11,5	7,5	9,8	11,5
	APX4J	8	8,3	9	9
	APX4H	7	6,8	9	7
34 DIAS	NT	11,8	10,2	12,5	11,8
	APX4J	12,5	10	8	13,5
	APX4H	7	9	9,5	10
41 DIAS	NT	11,8	10,5	12,5	12,5
	APX4J	12,5	10	8	13
	APX4H	7	9	9,5	10
44 DIAS	NT	12,5	11	12,7	12,6
	APX4J	12,7	13	12	13
	APX4H	8	10	13	12

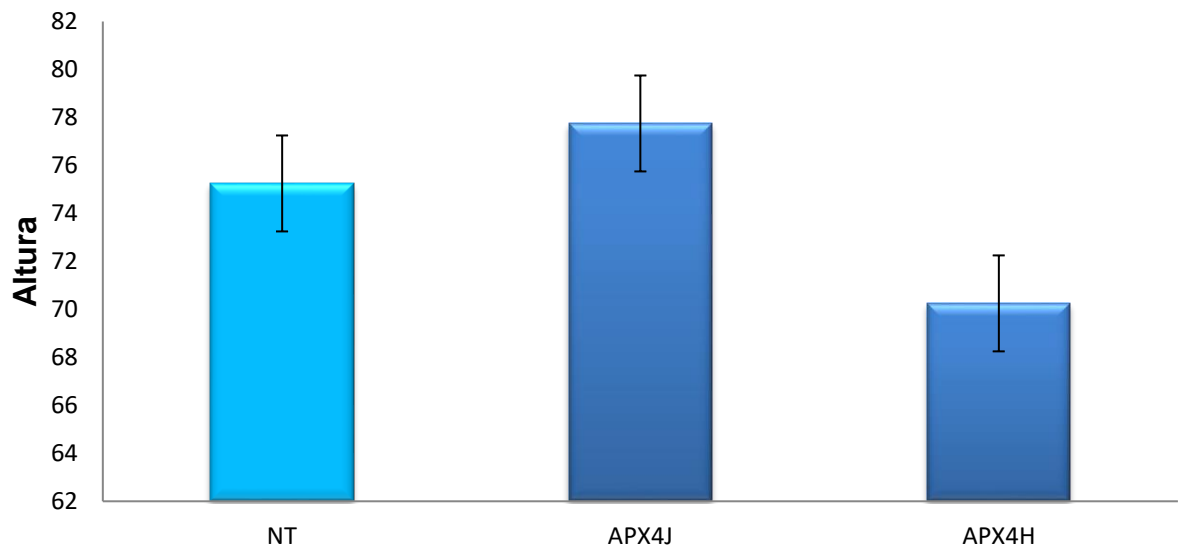




**Figura 10.** Análise fenotípica das plantas RNAiOsAPX4 e NT ao longo do desenvolvimento. Foram crescidas e plantas de cada genótipo. As fotos são representativas das repetições. Aos 57 dias , é possível observar maior número de folhas senescentes nas plantas silenciadas para o gene APX4 do que plantas NT.

#### 4.2.2- Análise da altura

A fim de comparar o crescimento de duas linhagens RNAiOsAPX4 com plantas NT, determinou-se a altura de 24 plantas aos 70 dias após a germinação. A altura média conferida corresponde à média de 8 plantas de cada genótipo, os dados foram submetidos a análise estatística (teste t), sendo que as linhagens não diferiram significativamente (Fig. 11).

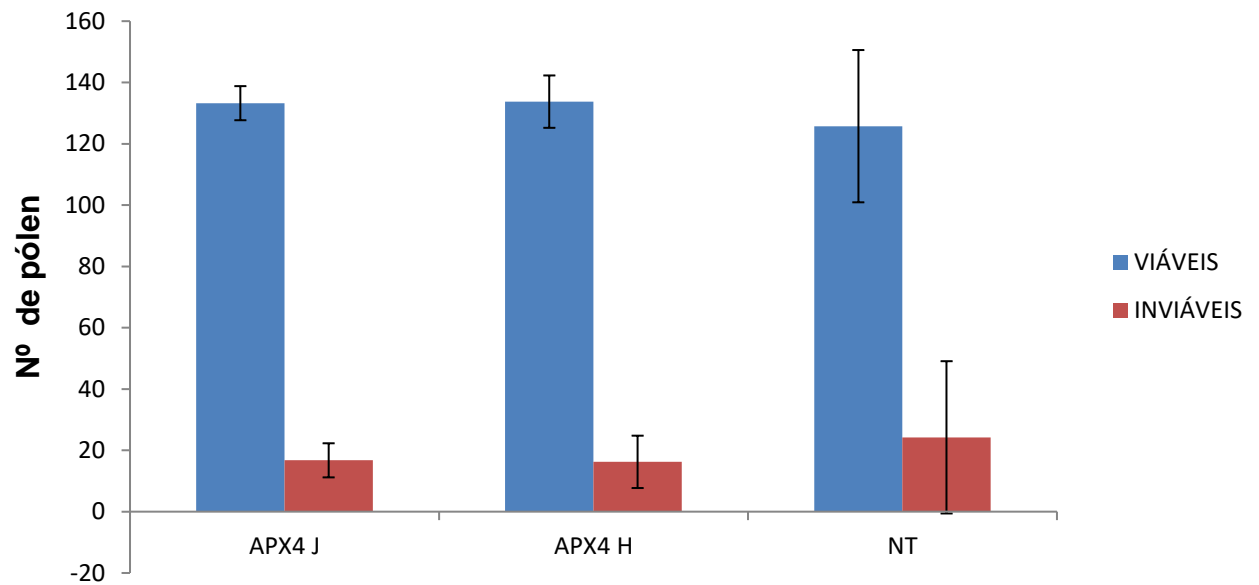


**Figura 11-** Análise da altura das plantas RNAiOsAPX4 e NT. A mensuração da altura foi realizada 40 dias após o plantio, com auxílio de uma trena. As medidas correspondem a altura média de 8 plantas por genótipo. Os presentes dados demonstram que não ocorreu diferença significativa entre os genótipos, análise obtida via test t ( $p < 0,05$ ).

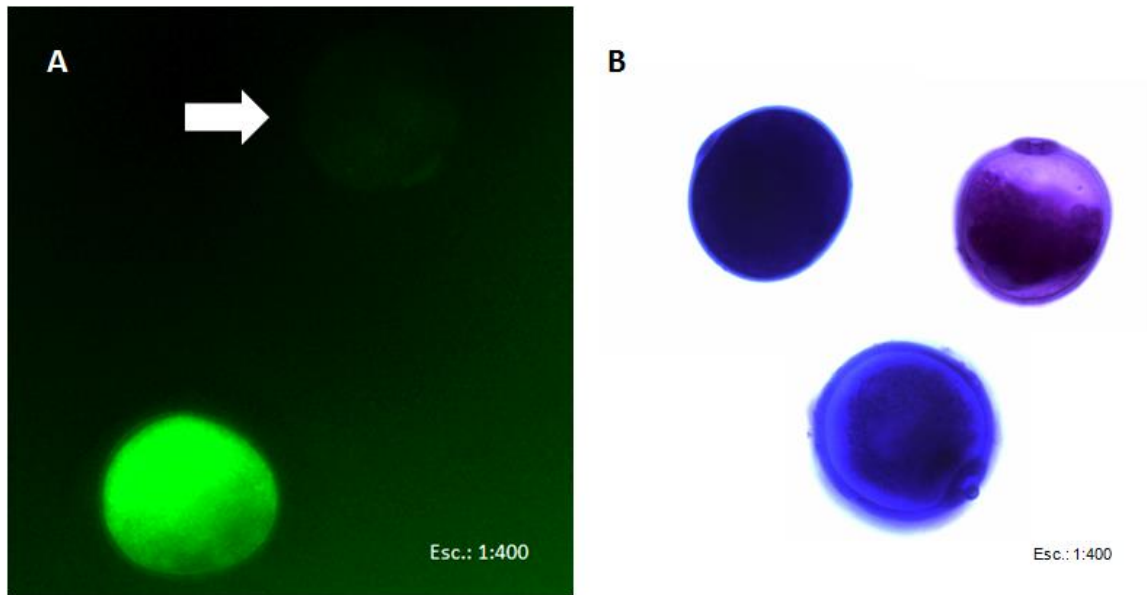
#### 4.2.3- Análise do pólen

Aos três meses após o plantio, as linhagens RNAiOsAPX4 J e H emitiram a folha bandeira e iniciaram seu florescimento. As plantas NT tiveram um atraso de mais ou menos uma semana para o início da floração.

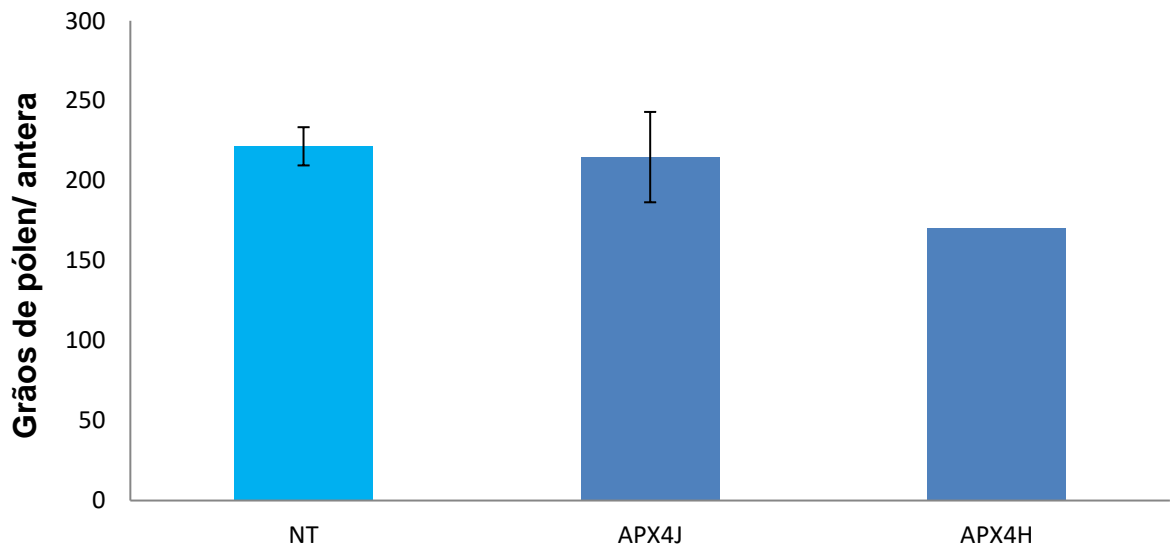
Como o florescimento é a fase final do desenvolvimento de uma planta e está diretamente relacionado à senescência foliar (THOMAS; HOWARTH, 2000), buscou-se verificar se a senescência e o florescimento precoce nas plantas silenciadas poderiam causar alguma diferença em relação ao número e viabilidade de grãos de pólen. Para isso, utilizou-se dos métodos de coloração por FDA (Fig.12 e 13) para verificar a viabilidade do pólen e de Alexander para quantificar o número de grãos de pólen por antera (Fig.14). Os resultados obtidos a partir de ambas análises não apontaram diferenças significativas entre as linhagens em relação a viabilidade e número de grãos de pólen/ antera.



**Figura 12.** Análise da viabilidade dos grãos de pólen das linhagens RNAiOs*APX4* e NT. Por meio do método de coloração FDA (Diacetato de fluoresceína), os grãos-de-pólen foram corados e identificados como viáveis ou inviáveis. Foram contabilizados 200 grãos-de-pólen por planta, sendo avaliadas 8 plantas por genótipo. Os gráficos representam o número médio de grãos-de-pólen nas condições viáveis e inviáveis, dos três genótipos aqui estudados. Não ocorreu diferença significativa entre as linhagens, de acordo com o teste estatístico t ( $p < 0,05$ ).



**Figura 13.** Diferenciação dos grãos-de-pólen viáveis dos inviáveis. Na imagem da figura A (campo escuro), pode-se observar a diferença de coloração da célula viável (verde fluorescente) e da célula inviável (indicada com a seta branca). A figura B representa um grão-de-pólen corado com a coloração de Alexander. Este corante foi utilizado na contagem de número de grão-de-pólen por antera

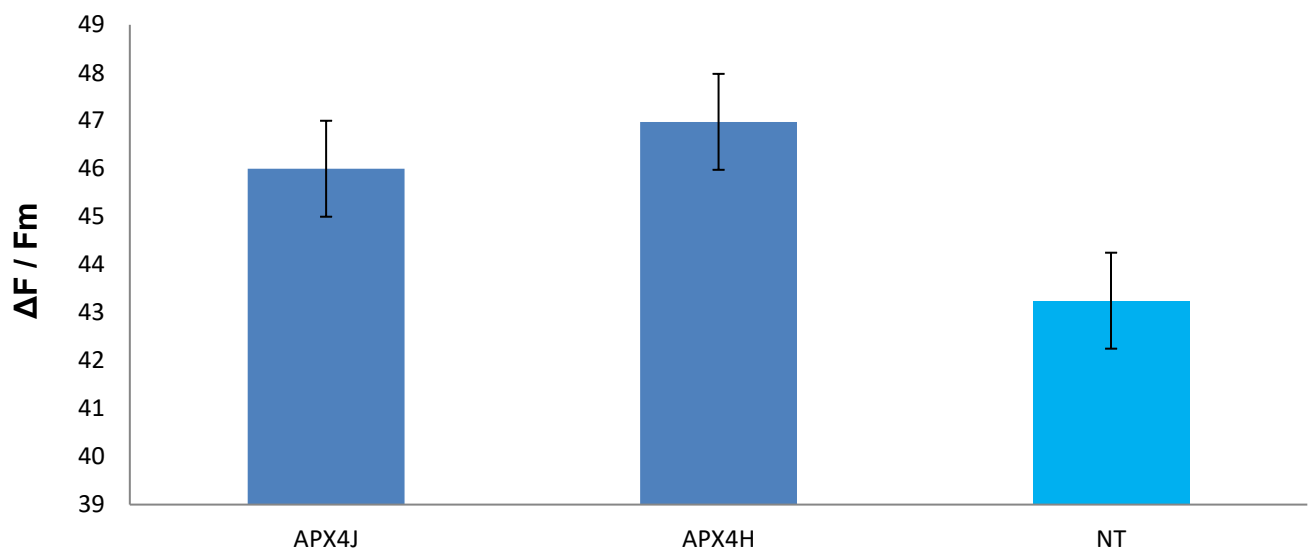


**Figura 14.** Análise do número de grãos de pólen por antera, via método de coloração de Alexander, das plantas RNAiOsAPX4 e NT. Uma antera, de cada uma das 8 plantas de cada linhagem, foi aberta e submetida a coloração de Alexander. Após esse procedimento foram contabilizados por meio de um microscópio óptico de fluorescência Olympus CXX41 o número total de grãos-de-pólen por antera. Os

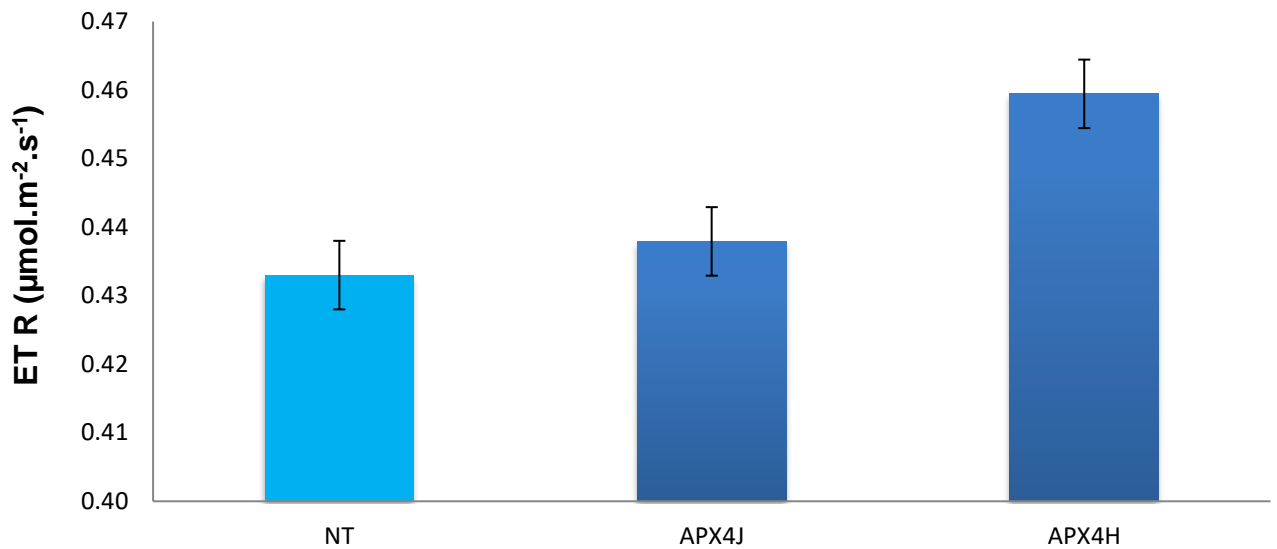
resultados apresentados nestes gráficos correspondem à média deste número por genótipo. Os valores obtidos foram analisados via Teste t, sendo considerado significativo apenas os valores que  $p < 0,05$ .

#### 4.2.4- Análise fotossintética

Para entender melhor a possível causa do estado de senescência precoce das plantas RNAiOsAPX4, foi realizada uma avaliação do aparato fotossintético via fluorescência da clorofila, essa técnica permitiu a obtenção de informações qualitativas e quantitativas sobre a condição fisiológica deste sistema. Os resultados da avaliação da eficiência efetiva do Fotossistema II e do transporte relativo de elétrons do Fotossistema II nas plantas transformadas e não transformadas, não apresentaram diferença significativa pelo Teste t (grau de significância  $p < 0.05$ ) (Fig.15 e Fig.16).

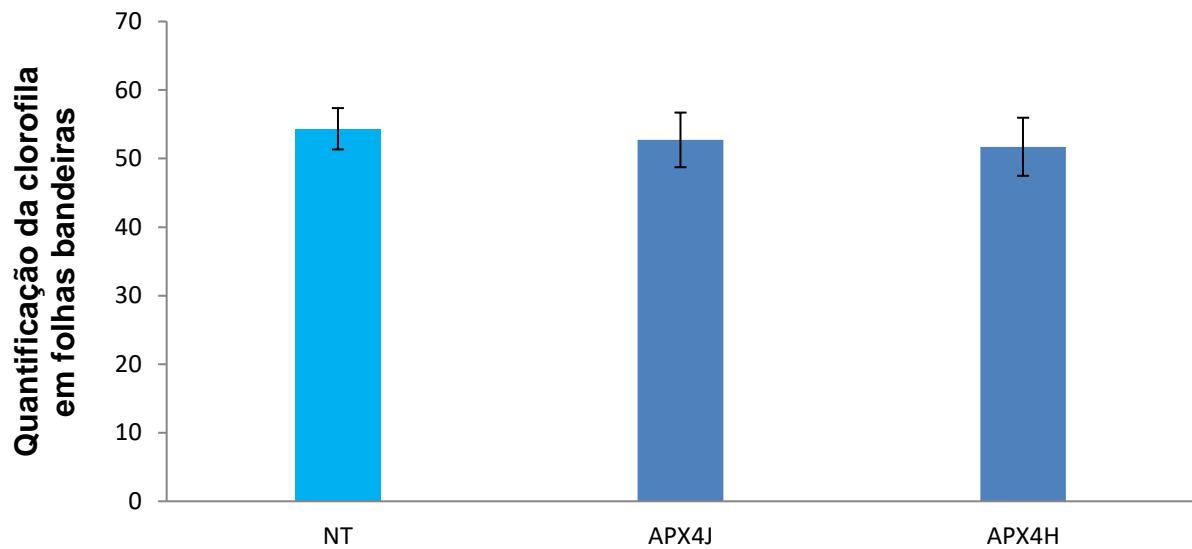


**Figura 15-** Avaliação fotossintética referente ao rendimento quântico efetivo do fotossistema II (PSII) das folhas bandeira, das plantas RNAiOsAPX4 e NT. Análise do rendimento quântico efetivo ( $\Delta F / F_m$ ) foi realizada em 8 plantas de cada linhagem, por meio de fluorímetro de clorofila- OS1-FL. O fluorímetro foi ajustado para realizar a leitura em uma fonte de intensidade de  $3000 \mu E$ , durante 5 segundos a  $28^\circ C$ . Os resultados apresentados no gráfico representam o valor médio de  $\Delta F / F_m$  das folhas bandeira das linhagens em estudo. Os dados foram analisados via Teste t, grau de significância  $p < 0,05$ .



**Figura 16-** Avaliação fotossintética do transporte relativo de elétrons do Fotossistema II de folhas bandeiras das plantas RNAiOsAPX4 e NT. Análise do transporte relativo de elétrons do fotossistema II (ETR) foi realizada em 8 plantas de cada genótipo, por meio fluorímetro de clorofila- OS1-FL. Os parâmetros utilizados para essa análise foram: fonte de intensidade de 3000 µE, 5 segundos de leitura a 28°C. Os resultados apresentados no gráfico representam o valor médio de ETR das folhas bandeira das linhagens em estudo. Os dados foram analisados via Teste t, grau de significância  $p < 0,05$ .

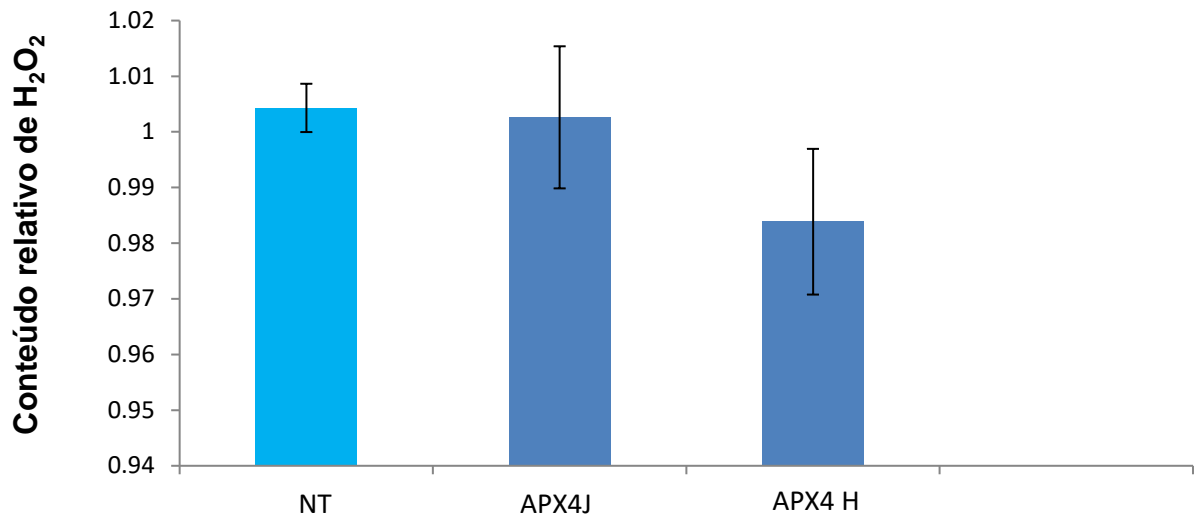
Juntamente a essas análises, foi realizada quantificação da clorofila das folhas bandeira, utilizando SPAD-502 Plus. Os resultados dessa análise demonstraram que não ocorreu uma diferença significativa na quantidade de clorofila nas folhas bandeira das plantas RNAiOsAPX4 e as NT (Fig.17).



**Figura 17.** Quantificação de clorofila de folhas bandeira. A quantidade de clorofila das folhas bandeira foi obtida por meio do aparelho SPAD- 502 Plus. Foram realizadas três medições para cada folha avaliada, a 28 °C. Os dados apresentados nesse gráfico correspondem ao valor médio das medidas obtidas em unidade SPAD, de 8 folhas de cada linhagem. Os valores foram avaliados via Teste t, grau de significância  $p < 0,05$ .

#### 4.2.5- Quantificação de $H_2O_2$

Outra análise realizada, a fim de entender a possível causa do fenótipo de senescência precoce das plantas RNAiOsAPX4 foi a quantificação da concentração de  $H_2O_2$  das folhas bandeira das linhagens RNAiOsAPX4 e NT. Segundo a análise estatística, não ocorreu diferença significativa entre as concentrações de peróxido entre as linhagens (Fig.18).

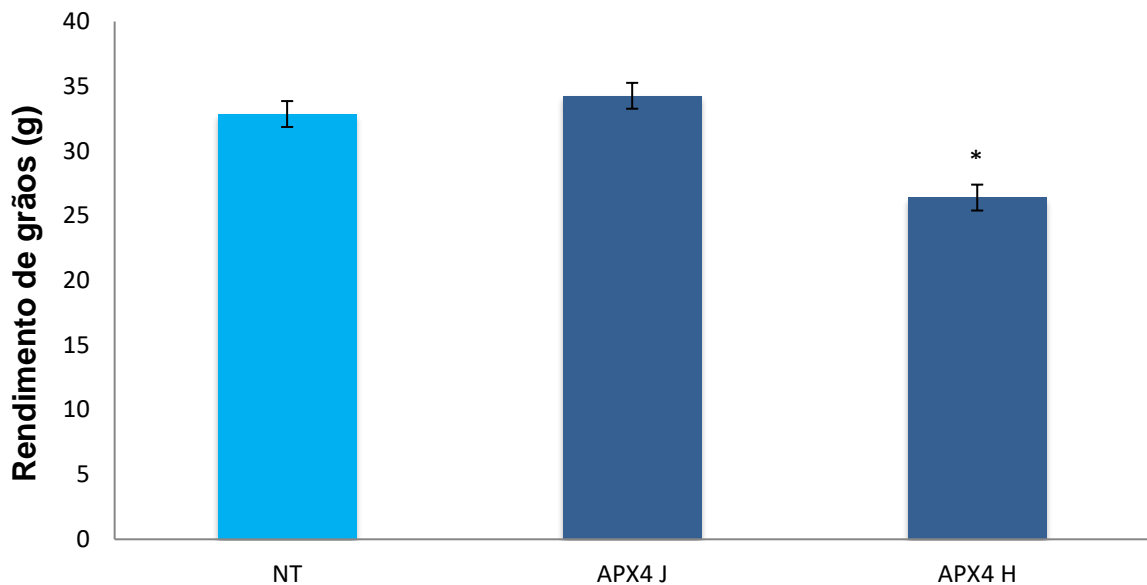


**Figura 18.** Análise do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das folhas bandeira das plantas RNAiOsAPX4 e NT. Para realização desta análise foi utilizado o método de oxidação Amplifu<sup>®</sup> Red (Sigma-Aldrich). Os dados plotados no presente gráfico correspondem ao valor médio da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 8 plantas de cada genótipo. Os dados foram analisados via Teste t (grau de significância p<0,05).

#### 4.2.6- Análise da produção

A avaliação do rendimento médio de grãos/ genótipo visava verificar se o silenciamento do gene *OsAPX4* poderia afetar a produtividade das plantas com esse genótipo (Fig.19). Os resultados da presente análise demonstram que ocorreu uma redução significativa no rendimento médio de grãos das plantas RNAiOsAPX4-H, sendo que nas demais linhagens o rendimento não diferiu.



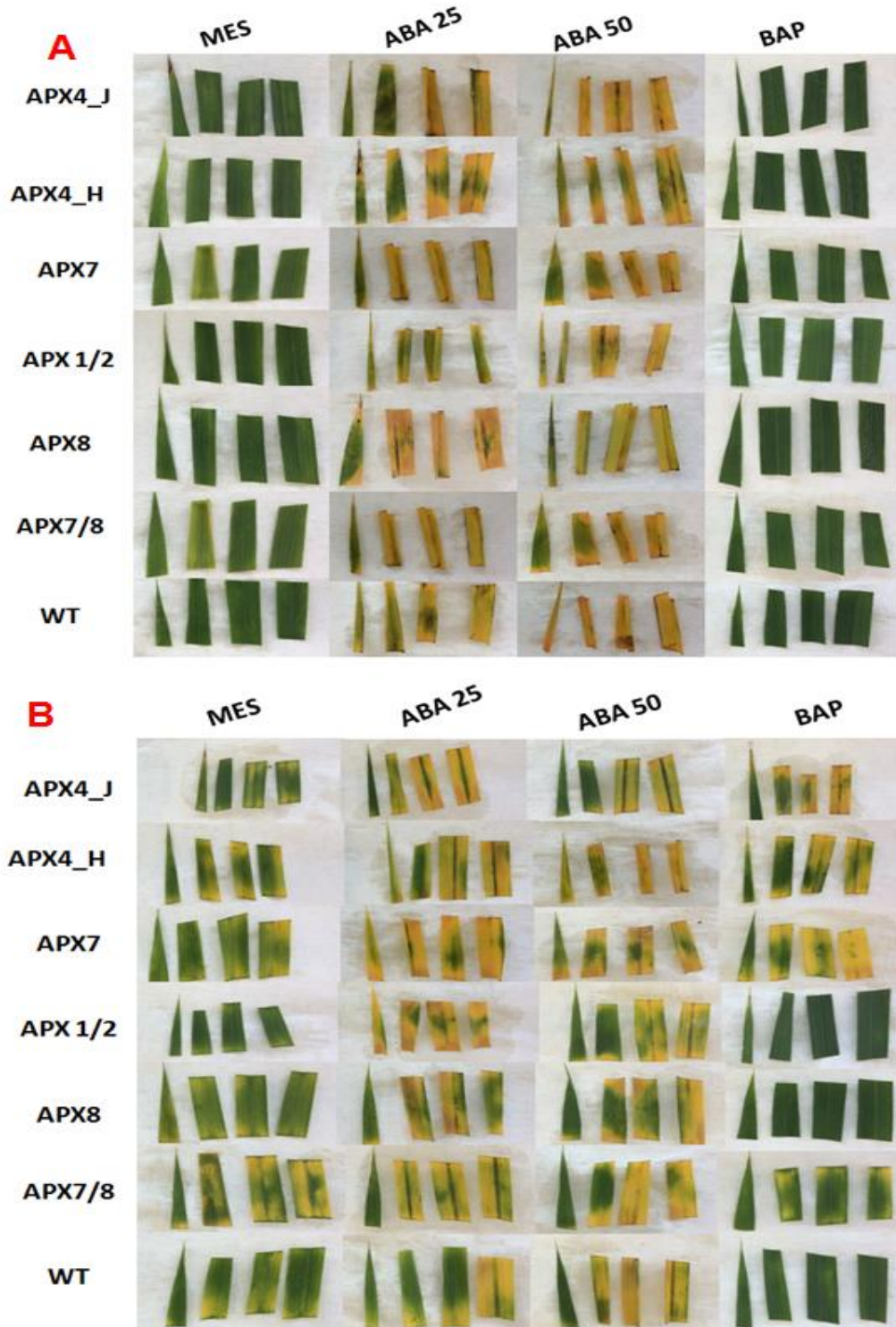


**Figura 19.** Rendimento médio de grãos por planta. Foram pesados os grãos de 8 plantas de cada linhagem. Os dados plotados neste gráfico correspondem o número médio de grãos produzidos por planta. Estes resultados foram submetidos ao teste estatístico t-student, com um grau de significância de  $p < 0,05$ .

#### 4.2.7- Senescência Induzida

Em um estudo anterior, RIBEIRO (2012) demonstrou que plantas silenciadas para o gene *OsAPX4* apresentam um fenótipo de senescência antecipada, fenótipo esse que foi confirmado em nossos experimentos (Figura 10). Entretanto, esse fenótipo foi pouco estudado havendo necessidade de uma análise mais detalhada desse estado fisiológico. Uma das questões que levantamos foi se o silenciamento de apenas as APX peroxissomais afetaria a senescência da planta, ou se seria um fenômeno geral, decorrente da alteração de qualquer uma das APX de arroz. Desta forma, realizou-se um experimento de indução da senescência com diferentes linhagens silenciadas nas várias APX. Nesse experimento, as linhagens (RNAi-APX1/2, APX4\_J, APX4-H, APX7\_(L8), APX8\_(L7), APX7/8 e Nipponbare) foram expostas a diferentes tratamentos (ABA 25  $\mu$ l, ABA 50 $\mu$ l, BAP 50  $\mu$ l e MES- controle) nas condições de claro e escuro. Os resultados desse experimento demonstraram que as diferentes linhagens, na condição de claro, apresentaram o mesmo comportamento quando submetidas aos diferentes tratamentos (Fig.20A). Entretanto, na condição de escuro percebe-se apenas que as linhagens RNAi*OsAPX4* (peroxissomal) e RNAi*OsAPX7* (cloroplastídica) apresentaram senescência foliar, mesmo na presença de citocinina

BAP, reconhecida como inibidora de senescência, diferindo das linhagens restantes. Pode-se observar nessa condição que a senescência não foi causada pela exposição a ABA e sim pelo escuro (Fig.20B).



**Figura 20.** Indução de senescência em plantas RNAiOsAPX e NT, condição claro e escuro. A- condição de claro, B- condição de escuro. Pedacos de folhas das

diferentes linhagens de RNAi e de Nipponbare foram expostas a tratamentos com: ácido abscísico (ABA) em concentrações de 25  $\mu$ M e 50 $\mu$ M (indutor), 50  $\mu$ M 6-benziladenina- BAP (inibidor) e MES (controle), em condição de claro (Fig 20A) e escuro (Fig.20B). Após 7 dias de tratamento foi realizada análise visual da coloração das folha.

## 5.0- DISCUSSÃO

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas através de múltiplos mecanismos que ocorrem nas membranas celulares, cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomas e retículo endoplasmático. Para manter os níveis de ERO de forma que não sejam tóxicas, as células contam com um conjunto de mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos. Entre esses mecanismos, estão as enzimas APXs, que se fazem presentes em diversos compartimentos da célula. Estudos de caracterização funcional demonstraram que as oito isoformas de APXs presentes em arroz desempenham diferentes papéis na homeostase redox. Os estudos conduzidos por Ribeiro (2012) e Rosa (2008) relatam que o silenciamento das APXs peroxissomais (APX3 e APX4) em plantas de arroz gerou um fenótipo de senescência antecipada. Esse fenótipo não foi descrito, até o momento, para nenhuma das outras isoformas. Plantas nocauteadas para o gene *AtAPX1* (citosólica) tiveram alterações no crescimento, bem como florescência tardia (SHULAEV et al., 2005). Por outro lado, plantas de arroz nocaute para as APXs de cloroplasto não apresentaram um fenótipo distinto de plantas não transformadas (CAVERZAN et al., 2014). A superexpressão da APX3 de peroxissomo de *A. thaliana* resultou em aumento do número de sementes em situação de seca e em uma maior tolerância ao estresse por 3-AT (inibidor de catalase) (YAN et al., 1999). Esses exemplos demonstram que alterações na expressão de enzimas antioxidantes em diferentes compartimentos subcelulares produzem efeitos distintos, indicando uma especificidade para cada uma delas. Portanto, o fenótipo de senescência precoce exibido pelas plantas silenciadas nas APX peroxissomais parece ser específico dessas isoformas e possivelmente, é causado por alterações na homeostase redox nessa organela.

O processo de senescência ocorre naturalmente nas plantas, sendo considerado a etapa final do desenvolvimento. No entanto, este processo é fortemente

influenciado por estresses internos e ambientais. Nesse sentido, o experimento de senescência induzida, que foi realizado com segmentos foliares das linhagens silenciadas para as diferentes APX, buscou verificar se essas enzimas estariam envolvidas com a senescência induzida em resposta a um estresse de luminosidade. Esses experimentos demonstraram que, além das plantas RNAiOsAPX4, segmentos foliares de plantas RNAiOsAPx7 também apresentaram senescência aumentada quando expostas a condições de estresse (Figura 19). Curiosamente, esse fenótipo não se reproduz quando o processo de senescência ocorre de forma natural, sendo que apenas as plantas silenciadas nas APX peroxissomais mostraram a condição de senescência precoce. Esse dado demonstra que, possivelmente, existam duas vias de sinalização diferentes para indução do processo senescência. Ou seja, a senescência induzida por estresse pode envolver sinais oriundos do peroxissomo e do cloroplasto, uma vez que OsAPX7 codifica uma APX cloroplastídica; enquanto que a senescência natural envolve apenas enzimas APX localizadas no peroxissomo.

A indução do processo de senescência, está associada a alterações dos níveis celulares de ERO, destacando-se  $H_2O_2$  (JAJIC; SARNA; STRZALKA, 2015). No presente estudo não foram detectadas diferença significativa entre as concentrações de  $H_2O_2$  nas plantas RNAiOsAPX4 e NT. Possivelmente, as alterações nos níveis de  $H_2O_2$  tenham sido muito sutis, sendo necessários outros métodos mais sensíveis para detectá-los. Portanto, ainda não é possível descartar que alterações nos níveis de ERO estejam na origem da sinalização que leva à indução de senescência nessas plantas.

A fim de elucidar quais genes apresentam um padrão de expressão alterado em função do silenciamento de *OsAPX4*, foi realizada uma análise de transcriptoma. O sequenciamento de alta qualidade de amostras de folhas L1 e L2 de plantas NT e RNAiOsAPX4 em triplicata e duplicata biológica, respectivamente, permitiu uma comparação robusta entre as bibliotecas obtidas. Os rígidos parâmetros estatísticos permitiram a identificação de um pequeno conjunto de genes diferencialmente expressos entre os genótipos estudados. Embora tenham sido amostradas folhas maduras (L1), cujos ápices já apresentavam sinais de senescência, não detectamos a expressão diferencial de genes tipicamente descritos como marcadores de senescência. Esse resultado possivelmente está relacionado ao tipo de material sequenciado, que foi a parte média das folhas L1. Como a senescência foliar em arroz

é iniciada no ápice foliar, é possível que a expressão dos genes descritos como marcadores de senescência também apresente um gradiente de expressão ao longo da lâmina foliar. Desta forma, acreditamos que a modulação da expressão destes genes na parte média das folhas não foi suficientemente ampla para ser detectada acima do critério de fold-change escolhido.

Embora o conjunto de genes identificados como diferencialmente expressos seja pequeno, eles auxiliaram na compreensão dos possíveis processos metabólicos impactados pelo silenciamento de *OsAPX4*. Destaca-se nesse conjunto a expressão diferenciada do gene *OsWRKY45* (Os05g25770). De acordo com uma análise de BLASTp, esse gene é semelhante ao gene *WRKY70* de *Arabidopsis* (At3G56400). Estudos descrevem (HÄ, 2015; LI; BESSEAU; PETRI, 2013; LI, 2004; ÜLKER; MUKHTAR; SOMSSICH, 2007) o gene *AtWRKY70* de *Arabidopsis thaliana* como sendo membro da família *AtWRKY*, que é umas das principais famílias gênicas responsável pela regulação do processo de senescência. Este gene é definido como um regulador negativo do processo de senescência natural. ÜLKER e colaboradores (2007), relatam em seu estudo com *arabidopsis* que o gene *AtWRKY70* foi constitutivamente expresso durante todas as fases de desenvolvimento foliar, sendo que a maior intensidade de sinal ocorreu em folhas senescentes.

Foi detectada também a expressão diferencial de genes codificadores de uma gama de enzimas que estão envolvidas com o metabolismo de aminoácidos e respostas oxidativas. De um modo geral, esse genes estão relacionados com a síntese de compostos secundários (fenilpropanóides e lignina) e sua expressão apresenta-se diminuída nas plantas silenciadas. Esse resultado indica que as células possivelmente estejam se reprogramando para que ocorra o evento de apoptose. Desta forma, elas investem menos energia na produção de compostos essenciais e mais para a manutenção de tecidos jovens (BREEZE et al., 2011).

Genes envolvidos com o processo de florescimento também apresentaram maior expressão nas plantas silenciadas. O gene *OsFTL4* (Os09g33850.1), que codifica uma proteína de ligação a fosfatidiletanolamina, tem sua expressão aumentada em ápices foliares e sementes. Este gene é um dos componentes da família RFT (Rice flowering locus T), que é homóloga a família FT (Flowering locus t) de *A. thaliana* (SUN et al., 2014). A RTF é considerada de suma importância para a

regulação do processo de florescimento de plantas de arroz, sendo seus genes responsivos a alterações de fotoperíodo. Além disso, MA et al. (2006) descreveram em seu estudo o fenótipo senescência apical para plantas de arroz silenciadas para sete genes *OsFTL*, incluindo *OsFTL4*. Outro gene detectado foi FPF1-like protein (*Os07g47450*), que é descrito como gene regulador do florescimento dos meristemas apicais.

Pesquisas realizadas em espécies monocarpicas têm associado o processo de senescência natural com o processo de reprodução (DISTELFELD; AVNI; FISCHER, 2014; SAKURABA et al., 2016). Fenótipos de senescência precoce associados a florescimento antecipado já foram descritos por Upadhyay e colaboradores (2014). No presente estudo, as plantas RNAi*OsAPX4* apresentaram não somente a senescência precoce e a antecipação do florescimento, como também a emissão antecipada da panícula. Sugere-se que essa antecipação de processos em plantas senescentes esteja associada ao tempo necessário para a planta remobilizar de forma eficiente seus nutrientes (ROGERS; MUNNÉ-BOSCH, 2016). Desta forma, espera-se que por meio dos genes de florescimento *OsFTL4* e FPF1-like protein, seja possível elucidar qual é a relação que existe entre os processos de florescimento e senescência antecipada com o silenciamento de *OsAPX4* em plantas de arroz.

Alguns estudos demonstraram que os níveis de ERO se alteram durante o processo de senescência (ROGERS; MUNNÉ-BOSCH, 2016b; SEDIGHEH et al., 2011). XU e colaboradores (2014), relataram que alterações no níveis de ERO podem influenciar a produtividade e a viabilidade do pólen. Os grãos-de-pólen contêm inúmeros antioxidantes solúveis, enzimas e compostos de baixo peso molecular (ácido ascórbico, glutatona, flavonóides e carotenóides) (JOANNE; DENIS, 1998), que os protegem das ERO quando estão em níveis basais. Entretanto, o acúmulo destas moléculas pode gerar danos irreversíveis na formação e desenvolvimento dos grãos-de-pólen. Nesse sentido, realizamos algumas análises visando avaliar se o silenciamento de *APX4* teria algum impacto para a viabilidade do pólen. Os experimentos de coloração por FDA e Alexander demonstraram que não houve qualquer alteração na produtividade e viabilidade do pólen, sugerindo que, mesmo que tenham ocorrido alterações nos níveis de ERO, estas não foram suficientes para alterar a condição morfofisiológica dos grãos-de-pólen.

Os resultados da análise do rendimento de grãos estão de acordo com a análise fotossintética, a qual não indicou alterações significativas no funcionamento do sistema fotossintético (Fig.14 e 15) e nem nas concentrações de clorofila (Fig.16) em plantas RNAiOsAPX4 . As plantas RNAiOsAPX4-J não apresentaram diferença significativa em seu rendimento em relação as NT. Sugere-se que a diferença de rendimento apresentada na linhagem RNAiOsAPX4-H esteja associada à baixa estatura de uma de suas exemplares. Essa redução de tamanho acarretou uma diminuição da área foliar dessa planta e, conseqüentemente, a redução de grãos. De acordo com o que foi relatado, não se pode considerar que o silenciamento da APX4 seja o causador da redução do rendimento nas plantas RNAiOsAPX4-H, sendo esse um fato isolado.

## **6.0- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

A partir dos resultados descritos no presente estudo conclui-se que o silenciamento do gene *OsAPX4* não afeta o crescimento da planta. Todavia, ele influencia o tempo de floração e a senescência foliar, sugerindo que o gene *OsAPX4* desempenha um importante papel na sinalização via ERO.

Outras análises ainda precisam ser realizadas:

- Os dados do transcriptoma ainda passarão por uma análise minuciosa.
- Expressão de genes marcadores de florescimento será avaliada em plantas jovens, antes do período de florescência, por RT-qPCR.

## 7.0- BIBLIOGRAFIA

ALEXANDER, M.P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. **Stain Technology**, v.62, p.107-112, 1969.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.

APEL, K.; HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 373–399, 2004a.

APEL, K.; HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 373–399, 2004b.

ASADA, K. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions 1. **Plant Physiol.**, v. 141, n. June, p. 391–396, 2006.

ASHIKARI, M.; MA, J. F. Exploring the power of plants to overcome environmental stresses. **Rice a SpringerOpen Journal**, n. December 2014, p. 12284, 2015.

BONIFACIO, A. et al. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, p. 1705–1722, 2011.

BREEZE, E. et al. High-resolution temporal profiling of transcripts during Arabidopsis leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. **The Plant cell**, v. 23, n. 3, p. 873–94, 2011.

CAN, S. et al. A NAC transcription factor NTL4 promotes reactive oxygen species production during drought-induced leaf senescence in Arabidopsis. **Plant Physiol**, v. 113, n. 5, p. 313–319, 1997.

CAN, S.; AMASINO, R. M. Making Sense of Senescence' Molecular Genetic Regulation and Manipulation of Leaf Senescence. **Plant Physiol**, v. 113, p. 313–319, 1997.

CAVERZAN, A. et al. **Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection** **Genetics and Molecular Biology**, 2012.



CAVERZAN, A. et al. Plant Science The knockdown of chloroplastic ascorbate peroxidases reveals its regulatory role in the photosynthesis and protection under photo-oxidative stress in rice. **Plant Science**, v. 214, p. 74–87, 2014.

CHRISTINE H. FOYER AND GRAHAM NOCTOR. Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 4, p. 861–905, 2009.

COUNCE, P. A.; KEISLING, T. C.; MITCHELL, A. J. A uniform, objectives, and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science**, v. 40, n. 2, p. 436–443, 2000.

DE VASCONCELOS, A C. F. et al. Enzymatic Antioxidant Responses To Biostimulants in Maize and Soybean Subjected To Drought. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 3, p. 395–402, 2009.

DEL RIO, L. A. et al. The Activated Oxygen Role of Peroxisomes in Senescence. **Plant physiology**, v. 116, n. 4, p. 1195–1200, 1998.

DHINDSA, R. S.; PLUMB-DHINDSA, P.; THORPE, T. A. Leaf Senescence : Correlated with Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation , and Decreased Levels of Superoxide Dismutase and Catalase. **Journal of Experimental Botany**, v. 32, n. 126, p. 93–101, 1981.

DISTELFELD, A.; AVNI, R.; FISCHER, A. M. Senescence , nutrient remobilization , and yield in wheat and barley. **journal of experimental botanic**, v. 65, n. 14, p. 3783–3798, 2014.

EA003. [s.d.].

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants : a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment**, v. 28, p. 1056–1071, 2005.

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

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Plant Physiology and Biochemistry Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010.

GOFF, S. A. Rice as a model for cereal genomics. **Rice genomics**, v. 2, p. 86–89, 1999.

GUEDES, R. L. M. et al. Amino acids biosynthesis and nitrogen assimilation pathways : a great genomic deletion during eukaryotes evolution. **BMC Genomics**, v. 12, n. Suppl 4, p. S2, 2011.

HÄ, E. **Keeping Control: The Role of Senescence and Development in Plant Pathogenesis and Defense**. [s.l.: s.n.].

IRGSP. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v. 436, n. August, p. 793–800, 2005.

JAJIC, I.; SARNA, T.; STRZALKA, K. Senescence, Stress, and Reactive Oxygen Species. **Plants**, v. 4, p. 393–411, 2015.

JING, H. C. et al. Ethylene-induced leaf senescence depends on age-related changes and OLD genes in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 421, p. 2915–2923, 2005.

JOANNE, P.; DENIS, H. E. R. Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. **Sex Plant Reprod**, v. 11, p. 65–80, 1998.

KARYOTOU, K.; DONALDSON, R. P. Ascorbate peroxidase, a scavenger of hydrogen peroxide in glyoxysomal membranes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 434, p. 248–257, 2005.

KHANNA-CHOPRA, R. Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen species-mediated chloroplast degradation. **Protoplasma**, v. 249, n. 3, p. 469–481, 2012.

KIM, D. et al. TopHat2 : accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions , deletions and gene fusions. **Genome Biology**, p. 1–13, 2013.

KIM, H. J. et al. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis. **PNAS**, v. 103, p. 2–7, 2006.

KIM, Y. H. et al. Expression of both CuZnSOD and APX in chloroplasts enhances tolerance to sulfur dioxide in transgenic sweet potato plants. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 338, n. 5, p. 307–313, 2015.

LI, J. The WRKY70 Transcription Factor : A Node of Convergence for Jasmonate-

- Mediated and Salicylate-Mediated Signals in. **Plant Cell**, v. 16, n. February, p. 319–331, 2004.
- LI, J.; BESSEAU, S.; PETRI, T. Defense-related transcription factors WRKY70 and WRKY54 modulate osmotic stress tolerance by regulating stomatal aperture in *Arabidopsis*. **New Phytologist**, p. 457–472, 2013.
- LIANG, C. et al. OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine-tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting senescence-associated genes in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 27, p. 10013–8, 2014.
- LIAO, Y.; SMYTH, G. K.; SHI, W. The Subread aligner : fast , accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 10, 2013.
- LIM, P. O.; KIM, H. J.; NAM, H. G. Leaf Senescence. **Annual Review of plant Biology**, p. 115–136, 2007.
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, p. 550, 2014.
- LU, Z.; TAKANO, T.; LIU, S. Purification and characterization of two ascorbate peroxidases of rice (*Oryza sativa* L.) expressed in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, 2005.
- MA, X. et al. A Robust CRISPR / Cas9 System for Convenient , High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 8, p. 1274–1284, 2006.
- MACHADO, S. et al. A formação e efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosei.J.**, v. 12, p. 133–149, 2005.
- MELOROSE, J.; PERROY, R.; CAREAS, S. No Title No Title. **Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015**, v. 1, 2015.
- MITTLER, R. Oxidative stress , antioxidants and. **Tree Genetics and Genomes**, v. 7, n. 9, p. 405–410, 2002.
- MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 10, p. 490–498, 2004.
- NAJAMI, N. et al. Ascorbate peroxidase gene family in tomato: Its identification and

characterization. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 279, n. 6, p. 576–580, 2008.

NARENDRA, S. et al. The Arabidopsis ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for Arabidopsis growth and development. **Journal of experimental botanic**, v. 57, n. 12, p. 3033–3042, 2006.

NELSON, DAVID L; M. COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6<sup>a</sup>. ed. [s.l: s.n.].

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Intracellular Redox Compartmentation and ROS-Related Communication in Regulation and Signaling 1 [ OPEN ]. **Plant Physiology**, v. 171, n. July, p. 1581–1592, 2016.

PETERHANSEL, C. et al. Christoph Peterhansel,. **The Arabidopsis Book**, v. 1, p. 1–24, 2010.

POTTERS, G.; HOREMANS, N.; JANSEN, M. A K. The cellular redox state in plant stress biology--a charging concept. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 48, n. 5, p. 292–300, maio 2010.

QUAN, L.-J. et al. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of integrative plant biology**, v. 50, n. 1, p. 2–18, jan. 2008.

RAO, M. V et al. Jasmonic Acid Signaling Modulates Ozone-Induced Hypersensitive Cell Death. **The Plant cell**, v. 12, n. September, p. 1633–1646, 2000.

RIBEIRO, C. W. **Análise funcional das isoformas citosólicas e peroxissomais de ascorbato peroxidase em arroz (Oryza sativa)**, 2012.

RIBEIRO, C. W. et al. Modulation of genes related to specific metabolic pathways in response to cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants. **Plant Biology**, v. 14, p. 944–955, 2012.

ROGERS, H.; MUNNÉ-BOSCH, S. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species and Redox Signaling during Leaf and Flower Senescence : Similar But Different 1 [ OPEN ]. v. 171, n. July, p. 1560–1568, 2016a.

ROGERS, H.; MUNNÉ-BOSCH, S. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species and Redox Signaling during Leaf and Flower Senescence : Similar But

Different 1 [ OPEN ]. **Plant Physiology**, v. 171, n. July, p. 1560–1568, 2016b.

ROSA, S. B. **Caracterização funcional das isoformas citosólicas e peroxissomais de ascorbato peroxidase em arroz (Oryza sativa L.)**, 2008.

ROSA, S. B. et al. Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. **Phytochemistry**, v. 71, n. 5-6, p. 548–558, 2010.

SAKURABA, Y. et al. senescence in rice. **Plant Molecular Biology**, v. 1, p. 223–234, 2016.

SANDALIO, L. M. Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks ER. **Annals of Botany**, v. 116, p. 475–485, 2015.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress responses – what have genome-scale studies taught us ? **Genome Biology**, v. 3, p. 1–6, 2002.

SCHRADER, M.; FAHIMI, H. D. The peroxisome : still a mysterious organelle. **Histochem Cell Biol**, v. 129, p. 421–440, 2008.

SEDIGHEH, H. G. et al. Oxidative stress and leaf senescence. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 1, p. 477, 2011.

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 372, p. 1305–1319, 2002.

SHULAEV, V.; SCHLAUCH, K.; MITTLER, R. Cytosolic Ascorbate Peroxidase 1 Is a Central Component of the Reactive Oxygen Gene Network of Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 17, n. January, p. 268–281, 2005.

SIMPSON, S. D. et al. Two different novel cis-acting elements of erd1, a clpA homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. **Plant Journal**, v. 33, n. 2, p. 259–270, 2003.

SMITH, A. M. O.; RATCLIFFE, R. G.; SWEETLOVE, L. J. Activation and Function of Mitochondrial Uncoupling Protein in Plants \*. **The journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 51944–51952, 2004.

SONG, Y. et al. Age-Triggered and Dark-Induced Leaf Senescence Require the bHLH Transcription Factors PIF3, 4, and 5. **Molecular Plant**, v. 7, n. 12, p. 1776–1787, 2014.

SOUSA, R. H. V et al. Peroxisomal APX knockdown triggers antioxidant mechanisms favourable for coping with high photorespiratory H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced by CAT deficiency in rice. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, p. 499–513, 2015.

SUN, C. et al. Understanding the genetic and epigenetic architecture in complex network of rice flowering pathways. **Protein and Cell**, v. 5, n. 12, p. 889–898, 2014.

TAJVAR, Y. et al. Antioxidant changes of Thomson navel orange (*Citrus sinensis*) on three rootstocks under low temperature stress. **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 52, n. 6, p. 576–580, 2011.

TEIXEIRA, F. K. et al. Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: Inferences from the rice genome. **Journal of Molecular Evolution**, v. 59, n. 6, p. 761–770, 2004.

THOMAS, H.; HOWARTH, C. J. Five ways to stay green. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. February, p. 329–337, 2000.

TOBERGTE, D. R.; CURTIS, S. No Title No Title. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

ÜLKER, B.; MUKHTAR, M. S.; SOMSSICH, I. E. The WRKY70 transcription factor of *Arabidopsis* in *X. uences* both the plant senescence and defense signaling pathways. **Planta**, v. 137, p. 125–137, 2007.

UPADHYAY, R. K. et al. The EAR Motif Controls the Early Flowering and Senescence Phenotype Mediated by Over-Expression of SIERF36 and Is Partly Responsible for Changes in Stomatal Density and Photosynthesis. **Plos ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–9, 2014.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. DE. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1184–1192, ago. 2008.

WANG, L. et al. Comparative analyses of C<sub>4</sub> and C<sub>3</sub> photosynthesis in developing leaves of maize and rice. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 1158–1165, 2014.

WANG, L.; WANG, S.; LI, W. RSeQC : quality control of RNA-seq experiments. **Bioinformatics applications note**, v. 28, n. 16, p. 2184–2185, 2012.

WATANABE, M. et al. Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in

Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 162, n. 3, p. 1290–1310, 2013.

XU, J.; LIU, Q.; JIA, M. Generation of reactive oxygen species during cryopreservation may improve *Lilium x siberia* pollen viability. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, p. 369–375, 2014.

YAMADA, T. et al. iPath2.0: interactive pathway explorer. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. May, p. 412–415, 2011.

YAN, J. et al. Photosynthesis and Seed Production under Water-Deficit Conditions in Transgenic Tobacco Plants That Overexpress an Arabidopsis Ascorbate Peroxidase Gene. **Crop Science Society of America**, v. 43, p. 1477–1483, 1999.

YAN, S. et al. Comparative Proteomic Analysis Provides New Insights into Chilling Stress Responses in Rice \*. **Proteomics**, v. 23, p. 484–496, 2006.

ZHANG, C. J. et al. Photosynthetic decline in flag leaves of two field-grown spring wheat cultivars with different senescence properties. **South African Journal of Botany**, v. 72, n. 1, p. 15–23, 2006.

#### **SITES:**

SOSBAI, Recomendação Técnica de Pesquisa do Sul do Brasil, 2014. Disponível: <http://www.irga.rs.gov.br/conteudo/4869/irga-divulga-estimativa-da-safra-2014/2015>. Acesso 11/11/2016, 10:45

IRGA. Disponível: <http://www.irga.rs.gov.br>. Acesso 11/11/2016, 10:00

Manual do aparelho OS1p. Disponível: <http://www.optisci.com/os1p.html>. Acesso: 22/03/2017, 15:54.

Manual do aparelho SPAD-502 Plus: Disponível: <http://sensing.konicaminolta.com.br/products/medidor-de-clorofila-spad-502plus>. Acesso: 10/02/2017, 16:00.