



Universidade Federal do Ceará
Centro de Ciências
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Pós - Graduação em Bioquímica

JOÃO HENRIQUE FROTA CAVALCANTI

Caracterização da família multigênica da oxidase alternativa em plantas do gênero *Medicago*
e avaliação da expressão em *Medicago sativa* sob condições de estresse

FORTALEZA - CE

2011

JOÃO HENRIQUE FROTA CAVALCANTI

Caracterização da família multigênica da oxidase alternativa em plantas do gênero *Medicago* e avaliação da expressão em *Medicago sativa* sob condições de estresse

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito para a obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Bioquímica vegetal. Orientador: Professor Dr. José Helio Costa.

FORTALEZA - CE

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

C366c Cavalcanti, João Henrique Frota.
Caracterização da família multigênica da oxidase alternativa em plantas do gênero *Medicago* e avaliação da expressão em *Medicago sativa* sob condições de estresse / João Henrique Frota Cavalcanti. – 2011.
73 f. : il. color., enc.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2011.
Orientação: Prof. Dr. José Hélio Costa.
Co-orientação: Prof. Dr. Dirce Fernandes de Melo.

1. Alfafa. 2. Oxidase alternativa. I. Título.

CDD 574.192

JOÃO HENRIQUE FROTA CAVALCANTI

CARACTERIZAÇÃO DA FAMÍLIA MULTIGÊNICA DA OXIDASE ALTERNATIVA EM
PLANTAS DO GÊNERO *Medicago* E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO EM *Medicago sativa*
SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE


Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Bioquímica, do Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do Título de
Mestre em Bioquímica. Área de
Concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovado em 15/07/2011.


BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Hélio Costa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof.ª Dr.ª Cristina Paiva da Silveira Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva de Castro
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

“Novas experiências levam a novas perguntas e novas soluções! Mudanças nos forçam a experimentar e nos adaptar! É assim que aprendemos e crescemos”

As aventuras de Calvin e Haroldo, Bill Watterson.

AGRADECIMENTOS

Durante esses mais de dois anos de curso de mestrado tenho que agradecer a várias pessoas e órgãos administrativos. Todos aqueles que conviveram comigo, ajudaram ou compartilharam dos difíceis caminhos tenham certeza da minha gratidão. Não posso mentir que não lembro de todos, mas os mais influentes e queridos gostaria de dedicar-me com mais carinho.

Ao Professor Doutor José Helio Costa, por ter me acolhido sob sua orientação desde meus primeiros passos da iniciação científica. Sou grato, principalmente, pelos ensinamentos dos conhecimentos das técnicas de biologia molecular utilizados por mim para a realização desse trabalho. Espero que tenha aprendido da melhor maneira possível. Agradeço pela paciência que ele teve durante a minha longa demora na escrita dessa dissertação. Tenho por ele um carinho muito grande, pois não se trata somente de um orientador, mas de um amigo que ganhei durante esses anos no laboratório de Bioenergética.

A líder do laboratório de Bioenergética, Professora Doutora Dirce Fernandes de Melo, por acreditar em mim. Eu sempre a considereei uma mentora que agradeço todos os conselhos durante esses vários anos em seu laboratório. Espero que tenha retribuído as expectativas e o carinho que sempre senti dela. Queria ser um bom escritor para poder escrever com exatidão os agradáveis sentimentos de amizade que tenho. Uma grande pessoa que com segue contagiar todos ao seu redor com o prazer que exista na pesquisa científica, apesar das dificuldades. Professora, muito obrigado por tudo!

Para ambos, ao mestre com carinho!

Ao Professor Ivan de Godoy Maia, Universidade Estadual Paulista (UNESP/Botucatu) por ter recebido os fragmentos gênicos para sequenciamento. Sou grato por ele nunca ter negado e sempre ter realizado os ensaios da maneira mais rápida possível apesar de saber dos elevados custos e tempos gastos na realização desse tipo de experimento.

Ao Professor Rodrigo Maranguape Silva da Cunha por ter aceitado fazer parte da minha banca examinadora e dispor a gastar um tempo para que esta dissertação seja concluída da melhor maneira possível.

A Professora Cristina Paiva da Silveira Carvalho por ter aceitado fazer parte da minha banca examinadora e dispor a gastar um tempo para que esta dissertação seja concluída da melhor maneira possível.

A Professora Doutora Maria Izabel Gallão, gostaria de agradecer por ter sido mais que uma professora durante a graduação e pela força dada durante as dúvidas que tive quando o que fazer depois do mestrado. Muito obrigado mesmo professora.

Minha família: Mirna, Juscelino e Renan (irmão) por acreditarem e apoiar-me durante os momentos que fraquejei durante esse tempo.

Ao grande amigo, Vladimir Magalhães. A ele não existem palavras que sejam suficientes para agradecê-lo a amizade verdadeira durante esse tempo de amizade. Aos agradáveis almoços no Burger King. Além disso, aos importantes momentos de discussão sobre ciências no qual me ajudaram a construir uma visão científica. Desejo a ele toda sorte e sucesso do mundo, pois sei das grandes qualidades que esse “cara” possui.

As grandes amigas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas: Gabriela Gabi Moteiro e Muciana Cunha, um agradecimento especial a duas, por toda ajuda nos momentos de avaliar resultados e discutir a respeito das técnicas de biologia molecular. Além disso, por serem pessoas incríveis que terão sempre minha amizade.

Aos amigos do Laboratório de Bioenergética por terem me agüentado todo esse tempo. São muito mais: alguns saíram durante o caminho por razões diversas (Welves, Marcela, Iara e Alana), mas outros continuam fortes ao meu lado (Deborah, Camila, Neuza, Edson Garantizado, Carol, Carine, Andressiane) e os mais novos membros (Dalton, Rafael, Lívia, Nayara, Bia, Nila, Pedro, Francisca, Kátia e Geórgia). Bem, pessoal! Vou sentir saudade de todos. Depois de tanto tempo junto nos separamos, mas isso é a vida. Desejo a todos sucesso e quero aproveitar pra dizer que vocês tem um grande amigo e que podem contar sempre.

Além desses vários estudantes, há uma pessoa especial por ter me ajudado nos experimentos de bancada, Khaterine (Costela) Beatriz. Muito obrigado!

Os amigos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) e aqueles que de alguma forma contribuíram na realização do mestrado ou por uma simples conversa bem humorada ajudando a relaxar nos momentos mais tensos.

Além dos agradecimentos pessoais, sou grato as agências administrativas que deram suporte financeiro e estrutural para a realização desse trabalho. São: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão de uma bolsa de estudo durante o período do mestrado e Universidade Federal do Ceará por dispor da infraestrutura necessária para realização dos meus experimentos.

SUMÁRIO

	Pagina
RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	16
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Funções da Oxidase Alternativa (Aox)	20
1.2. Família multigênica e organização no genoma da Oxidase Alternativa	21
1.3. Expressão gênica da Oxidase Alternativa	22
1.4. Regulação da expressão gênica da oxidase alternativa	25
1.5. <i>Medicago sativa</i> L. - Alfafa	26
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo geral	28
2.2. Objetivos específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Identificação dos genes da Oxidase Alternativa (Aox) em plantas do gênero <i>Medicago</i> .	29
3.1.1. Busca dos genes da Oxidase Alternativa (Aox) no genoma de <i>Medicago truncatula</i> por análise <i>in silico</i>	29
3.1.2 Clonagem, e seqüenciamento dos cDNAs da Aox de <i>Medicago sativa</i>	29
3.1.2.1. Amplificação dos produtos de RT-PCR para cada cDNA de MAox	30
3.1.2.2. Purificação e ligação dos produtos de PCR	30
3.1.2.3. Transformação de bactérias de <i>Escherichia coli</i> cepa JM109	30
3.1.2.4. Validação da transformação de <i>Escherichia coli</i> através de PCR em colônia	31
3.1.2.5. Extração de DNA plasmidial: mini preparação	32
3.1.2.6. Seqüenciamento e análise de bioinformática	33
3.1.2.7. Construção de árvore filogenética da Aox	33

3.2. Estudos da expressão dos genes da Aox em <i>Medicago sativa</i>	33
3.2.1. Material vegetal e condições de crescimento	33
3.2.2. Extração de RNA total de diferentes tecidos de <i>Medicago sativa</i> . Extração, quantificação e pureza do RNA total	34
3.2.3. Síntese da primeira fita de cDNA e reações de PCR	34
3.3. Estudos in silico dos promotores dos genes da Aox no gênero <i>Medicago</i>	35
3.3.1. Extração de DNA genômico e clonagem dos promotores de <i>Medicago sativa</i>	35
3.3.2. Análises e predição dos elementos funcionais nas regiões promotoras dos genes Aox1 e Aox2b1 do gênero <i>Medicago</i>	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Anotação dos genes Aox de <i>Medicago truncatula</i> , clonagem dos cDNAs da Aox de <i>Medicago sativa</i> e análise filogenética	37
4.2. Qualidade do RNA total extraído	40
4.3. Expressão da Aox durante o início da germinação de <i>Medicago sativa</i>	45
4.4. Efeitos do estresses na expressão dos genes da Aox em folhas e raízes de <i>Medicago sativa</i>	45
4.5. Qualidade do DNA extraído e clonagem dos promotores	49
4.6. Clonagem e análise dos promotores da Oxidase Alternativa de <i>M. sativa</i>	49
4.7. Análise e identificação in silico de elementos regulatórios dos promotores da Aox de <i>Medicago sativa</i>	49
5. DISCUSSÃO	60
5.1. Família multigenica da Aox do gênero <i>Medicago</i>	60
5.2. Expressão gênica da Oxidase Alternativa de <i>Medicago sativa</i>	60
5.3. Regulação da transcrição dos genes Aox	64
6. CONCLUSÃO	66
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

RESUMO

Oxidase Alternativa (AOX) em plantas é codificada por uma pequena família multigênica de origem nuclear (DNA genômico). Essa família multigênica foi bem estudada em mono e dicotiledôneas sendo subdividida em duas subfamílias: Aox1 e Aox2. Os genes Aox1 são encontrados em mono e eudicotiledôneas apresentando expressão mais relacionada a condições de estresses enquanto que os genes Aox2 são encontrados apenas em eudicotiledôneas com expressão constitutiva. Vários genes Aox1 e apenas um gene Aox2 são encontrados na maioria das eudicotiledôneas estudadas. Nesse trabalho, caracterizou-se a família multigênica da Aox no gênero *Medicago* (*Medicago truncatula* e *Medicago sativa*) pertencente à ordem Fabales. Em *Medicago truncatula*, a família multigênica da Aox foi caracterizada através de busca por bioinformática em bancos de dados identificando-se 4 genes Aox (Aox1, Aox2a, Aox2b1 e Aox2b2) no genoma dessa espécie revelando pela primeira vez uma duplicação do gene Aox2b. Oligonucleotídeos específicos desenhados para cada um dos genes foram usados para amplificação por PCR, clonagem e seqüenciamento parcial dos referidos genes em *Medicago sativa*. A expressão gênica foi estudada, através de RT-PCR semiquantitativa, em sementes durante a germinação (0, 24 e 48 horas de após embebição) e em raízes e folhas de *Medicago sativa* crescidas em meio hidropônico de Hoagland e submetidas a diferentes condições de estresse (0, 6, 12 e 24 hs após tratamento): controle, ácido salicílico (0,5 mM), PEG (100 g/L), H₂O₂ (10 mM) e cisteína (0,5 mM). Os resultados revelaram que todos os 4 genes Aox foram detectados em sementes de *Medicago sativa*, entretanto os genes Aox1, 2b1 e 2b2 apresentaram aumento da expressão durante a germinação enquanto que o Aox2a mostrou-se constitutivo. Em folhas os genes Aox1, 2a e 2b1 foram detectados em todas as condições testadas já o Aox2b2 foi detectado mais intensamente apenas nas condições de estresse. De maneira semelhante ao observado durante a germinação os genes Aox1, 2b1 e 2b2 tiveram expressão aumentada em resposta a todas as condições de estresse. O Aox2a mostrou-se constitutivo, mas foi intensamente expresso. Em raízes, todos os genes foram detectados e um perfil semelhante de indução dos genes Aox1, 2b1 e 2b2 também foi observado com exceção do tratamento com PEG onde apenas Aox1 foi induzido. O Aox2a também se mostrou constitutivo, mas foi fracamente expresso. Com a finalidade de se compreender melhor a co-expressão dos genes Aox1, 2b1 e 2b2 em *Medicago sativa* os promotores foram clonados e seqüenciados revelando regiões idênticas entre eles indicando o envolvimento de elementos cis comuns na regulação. Esses resultados corroboram com a co-expressão induzida por estresse de Aox1/Aox2b observada

anteriormente em feijão. Contudo, em *Medicago sativa*, observamos expressão diferencial entre tecidos: no tecido radicular os genes Aox1, Aox2a e 2b1 podem ser induzidos por estresses e/ou mostram uma característica de expressão. Por outro lado, em folhas o gene Aox2b2 diferenciou por apresentar apenas característica de gene induzido em condições de estresse.

Palavras-chaves: Oxidase alternativa, Aox2b duplicados, co-expressão e promoters

ABSTRACT

In plants, Alternative Oxidase (AOX) is encoded by small multi gene family located in genomic DNA. This multi gene family was studied in mono and dicots plants being clustered in two subfamilies: Aox1 and Aox2. Aox1 genes are found in all angiosperms taxon presenting gene expression related to stress situations while Aox2 genes are found in dicots plants only and presenting a housekeeping expression. Many Aox1 genes and just one Aox2 are found in the most of dicots studied. However, in Fabales, as cowpea and soybean, is found a profile with two genes Aox2 (Aox2a, Aox2b) and one Aox1 gene. In this work was characterized a multi gene family of Aox genes in *Medicago* genus (*Medicago truncatula* e *Medicago sativa*) belonging to Fabales Order. Data mining in GenBank characterized four Aox genes (Aox1, Aox2a, Aox2b1 and Aox2b2) in *Medicago truncatula* genome revealing for first time a duplication of Aox2b genes. Specific primers designed for each Aox gene and then were used to amplification by PCR, cloning and partial sequencing of these genes in *Medicago sativa*. Gene expression was carried out by semi-quantitative RT-PCR in: germination seeds (0, 24, 48 hours of germination), roots and leaves from *Medicago sativa* grown in Hoagland's medium and applied to distinct stress conditions (0, 6, 12 e 24 hs after treatment): control, salicylic acid (0,5mM), PEG (100g/L), H₂O₂ (10mM) e cysteine (0,5mM). The results revealed that all four Aox genes were detected in seed of *Medicago sativa*. However, Aox1, Aox2b1 and Aox2b2 genes presented high expression during germination while Aox2a showed constitutive expression. In leaves, Aox1, Aox2a and Aox2b1 were detected in all conditions tested, but Aox2b2 was observed more strong in stress situations only. Similarly observed in germination, Aox1, Aox2b1 and Aox2b2 increased transcripts levels in response to all stress conditions. Aox2a, one more time, had constitutive, but very strong expression. In roots, all genes were detected and a similar induction profile of Aox1, Aox2b1 and Aox2b2 were confirmed less to PEG treatment where just Aox1 was responsive. Aox2a had constitutive expression too, but it was weakly expressed. In order to understand the co-expression of Aox1, Aox2b1 and Aox2b2 genes, the promoter regions were cloned and sequenced revealing close motifs among them suggesting the involvement of cis-elements in their regulation. These results corroborate with co-expression stress-induced of Aox1/Aox2b found in cowpea. However, in *Medicago sativa*, it was observed tissue-specific expression. Aox1, Aox2a and Aox2b1 with characteristics constitutive and induced in seeds germination and roots tissue while in leaves Aox2b2 differed by present stress-induced expression only.

Key words: Alternative oxidase, Aox2b duplication, co-expression and promoters

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 01 -	18
Via da respiração alternativa da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial mostrando a localização de cada enzima. Em amarelo: NAD(P)H desidrogenase interna e externa, em verde: oxidase alternativa e em azul: proteína desacopladora.	
Figura 02 -	22
Organização exon/intron dos genes da Aox em plantas. (A) Estrutura exon/intron da Aox encontrada na maioria das espécies de plantas. (B) Adição ou remoção de exon e/ou intron na estrutura dos genes da Aox.	
Figura 03 -	37
Localização dos genes no cromossomo 5 de <i>Medicago truncatula</i>	
Figura 04 -	40
Comparação entre as quatro proteínas deduzidas de Aox retirados do genoma de <i>Medicago truncatula</i> . Alinhamento global gerado a partir das sequencias de proteínas deduzidos dos genes Aox de <i>Medicago truncatula</i> usando o software ClustalW (*) aminoácidos idênticos entres os membros da família. Em amarelo sublinhado, resíduo de cisteína conservados CisI e CisII) de acordo com Berthold et al., 2002.	
Figura 05 -	41
Sequencias parciais de nucleotídeos (letra minúscula) e aminoácidos deduzidos (letra maiuscula) de Aox de <i>Medicago sativa</i> .	
Figura 06 -	42
Comparação entre as três proteínas deduzidas de Aox clonados e seqüenciados a partir do cDNA de <i>Medicago sativa</i> . Alinhamento global gerado a partir das sequencias de proteínas deduzidos dos genes Aox de <i>Medicago sativa</i> usando o software ClustalW (*) aminoácidos idênticos entres os membros da família. Em amarelo sublinhado, resíduo de cisteína conservados (CisI e CisII) de acordo com Berthold et al., 2002.	

- Figura 07 - Árvore filogenética da Aox gerada pelo software MEGA5 a partir de 27 sequências de proteínas deduzidas de Aox [*Vigna unguiculata* (Aox1a, Aox2a, Aox2b), *Glycine max* (Aox1, Aox2a, Aox2b), *Lotus japonica* (Aox1, Aox2a, Aox2b), *Medicago truncatula* (Aox1, Aox2a, Aox2b1 e Aox2b2) *Medicago sativa* (Aox1, Aox2a e Aox2b2), *Phaseolus vulgaris* (Aox2b), *Cajanus cajan* (Aox1, Aox2b), *Cicer arietinum* (Aox1, Aox2a, Aox2b), *Arabidopsis thaliana* (Aox1a, Aox1b, Aox1c, Aox1d e Aox2)]. 43
- Figura 08 - Níveis de transcritos dos genes Aox em sementes de *Medicago sativa* durante as primeiras horas de germinação. O gene da Actina foi utilizado como gene de referência. Os produtos de RT-PCR foram detectados em gel de agarose 1,2% usando o corante brometo de etídio (0,5µg/mL). 45
- Figura 09 - Níveis de transcritos dos genes Aox de *Medicago sativa*, (A) folha e (B) raiz, submetidas aos seguintes condições de estresse: ácido salicílico 0,5mM, PEG 100,37g/L, H₂O₂ 10mM e Cisteína 0,5mM analisados por RT-PCR semi quantitativa. O gene da Actina foi utilizado como gene de referência. Os produtos de RT-PCR foram detectados em gel de agarose 1,2% usando o corante brometo de etídio (0,5µg/mL). 47
- Figura 10 - A) Eletroforese em gel de agarose 1,0%, coluna 1 DNA genômico extraído de folhas de *Medicago sativa* pelo método CTAB, coluna 2 marcador DNAlabber 1Kb (Promega, USA). (B) Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando os produtos de PCR amplificados e purificados dos promotores dos genes MsAox1 (coluna 1), MsAox2b2 (coluna 2) e marcaodr DNA labber 1Kb (coluna 3). (C) Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando os produtos de PCR amplificados e purificados dos promotores dos genes MsAox2b2 (coluna 1) e marcador DNA labber 1Kb (coluna 2). 49
- Figura 11- Fragmento gênico sequenciado a partir do DNA de *Medicago sativa*. Região do promotor do gene Aox1 de *Medicago sativa* usando primers específicos de acordo com a tabela 1. Em cinza, região 5'UTR e em amarelo região codante do gene Aox1. Abaixo da sequência nucleotídica sequência de aminoácidos da região codante em amarelo. Em verde região do vetor de ligação pGEMT-easy. 50

Fragmento gênico sequenciado a partir do DNA de *Medicago sativa*. Região do promotor do gene *Aox2b1* de *Medicago sativa* usando primers específicos de acordo com a tabela 1. Em cinza, região 5'UTR e em amarelo região codante do gene *Aox2b1*. Abaixo da sequência nucleotídica sequência de aminoácidos da região codante em amarelo. Em verde região do vetor de ligação pGEMT-easy.

Figura 12 - 51

Sequência de nucleotídeos do promotor *Aox1* de *Medicago sativa*. Os motivos regulatórios encontrados usando os softwares PlantCARE e PLACE estão em negritos e sublinhados. Em amarelo, os responsáveis a luz; em azul, envolvidos na resposta a estresses; verde, resposta a hormônios; cinza, tecido-específico. A região na caixa cinza em negrito corresponde a região TATA Box sugerida por Bernard et al., 2010. A trinca de nucleotídeos em negrito e itálico corresponde aos primeiros nucleotídeos transcritos.

Figura 13 - 53

Sequência de nucleotídeos dos promotor *Aox2b1* de *Medicago sativa*. Os motivos regulatórios encontrados usando os softwares PlantCARE e PLACE estão em negritos e sublinhados. Em amarelo, os responsáveis a luz; em azul, envolvidos na resposta a estresses; verde, resposta a hormônios; cinza, tecido-específico. A região na caixa cinza em negrito corresponde a região TATA Box sugerida por Bernard et al., 2010. A trinca de nucleotídeos em negrito e itálico corresponde aos primeiros nucleotídeos transcritos.

Figura 14 - 55

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 01 - Oligonucleotídeos iniciadores usados para análises de expressão gênica e clonagem parcial dos cDNAs de Aox de <i>Medicago sativa</i> .	28
Tabela 02 - Espécies de plantas como genoma seqüenciado e a localização dos genes Aox em cada cromossomo.	36
Tabela 03 - Comparação entre as quatro proteínas deduzidas de Aox retirados do genoma de <i>Medicago truncatula</i> realizado pelo alinhamento global das sequencias de aminoácidos deduzidos a partir do genes Aox de <i>Medicago truncatula</i> usando o software ClustalW.	38
Tabela 04 - Elementos regulatórios cis encontrados no promotor do gene de Aox1 de <i>Medicago sativa</i> e suas respectivas funções de posições na fita.	52
Tabela 05 - Elementos regulatórios cis encontrados no promotor do gene de Aox2b1 de <i>Medicago sativa</i> e suas respectivas funções de posições na fita.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aox: oxidase alternativa
BLAST: Basic Local Alignment of Search Toll
CARES: cis-acting regulatory elements
cDNA: DNA complementar ao RNA mensageiro
EROs: espécies reativas de oxigênio
EST: expressed sequences taq
GSS: genomic survey sequences
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HTGS: High throughput genomic sequences
IPTG: Isopropiltiogalactosídeo
LB: Luria-Bertani
NCBI: National Center for Biothecnology Information
pb: Pares de bases
PCR: Polimerase Chain Reaction
PEG: Polietilenoglicol
PTOX: plastideo treminal oxidase
RNAm: RNA mensageiro
RT-PCR: transcrição reversa acoplada a PCR
TBE: tampão Tris-Boro-EDTA
X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indoil-B-D-galactosídeo
WGS: Whole-genome shotgun reads

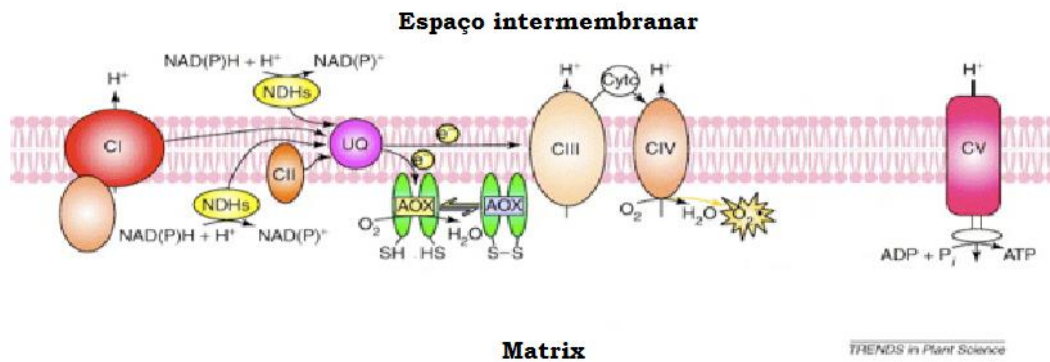
1 INTRODUÇÃO

As mitocôndrias são organelas encontradas em células eucarióticas, tendo como principal função a fosforilação oxidativa na qual ocorre a produção de energia química na forma de ATP (adenosina trifosfato) a partir da oxidação de ácidos orgânicos através da respiração celular (via clássica). Contudo, essa organela em plantas apresenta funções secundárias importantes para o funcionamento celular, tais como biossíntese de vitaminas, participação na via fotorrespiratória, metabolismo de aminoácidos e lipídios (MILLAR et al., 2005).

Em plantas, além da via clássica da respiração existe uma via de respiração alternativa composta por um sistema complexo de enzimas: NAD(P)H desidrogenase externa e interna, Proteína Desacopladora e Oxidase Alternativa (Figura 01). Essas enzimas desviam o fluxo de elétrons da cadeia transportadora de elétrons desacoplando a respiração celular da produção de ATP (CLIFTON et al., 2005). Dessas enzimas da via alternativa, a Oxidase Alternativa (AOX) é a mais bem estudada, sendo insensível ao cianeto, não-fosforilante, e responsável pela redução de oxigênio a H₂O a partir de elétrons do pool de ubiquinona reduzida (FINNEGAN et al., 2004; MØLLER et al., 2010). AOX está localizada na membrana mitocondrial interna situada entre os complexos II e III da cadeia transportadora de elétrons.

AOX é classificada como um membro da família de proteínas di-ferro carboxilase juntamente com outras três enzimas: PTOX, DMG hidroxilase e MME hidroxilase (BERTHOLD e STENMARK, 2003). Além da similaridade estrutural, essa família protéica possui a característica de reagir com oxigênio em reações de oxi-redução (KURTZ, 1997). As AOXs podem formar homodímeros, devido a pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína bastante conservados (122Cis_I e 172Cis_{II}, nomenclatura baseada em SgAOX1), cujos monômeros apresentam uma massa molecular variando entre 32 e 36 kDa. Os monômeros formam homodímero ligando-se covalentemente através de resíduos de cisteínas (forma oxidada) ou através de interações hidrofóbicas (forma reduzida) (BERTHOLD et al., 2000; BERTHOLD e STENMARK, 2003). A forma oxidada da AOX é mais ativa e pode ser regulada por α ceto-ácidos, como piruvato (UMBACH et al., 2006). Nos quase 50 anos de estudo sobre a oxidase alternativa em plantas, tem sido proposta que esta enzima desempenha papel na termogênese, (principalmente nas plantas da família Araceae), prevenção na formação de radicais livres, manutenção do ciclo do ácido tricarboxílico e reprogramação celular durante situações de estresse (ITO-INABA et al., 2009; MAXWELL et al., 1999; ARNHOLDT-SCHIMITT et al., 2006).

A importância potencial da AOX no metabolismo celular pôde ser comprovada através do primeiro seminário internacional sobre a Oxidase Alternativa em Évora, Portugal (2008). Desse encontro foi publicada uma edição especial sobre Oxidase Alternativa no jornal *Physiologia Plantarum: A international journal for plant biology* (volume 137, novembro de 2009). 15 artigos de pesquisa, 8 revisões e 1 artigo de opinião abordaram os mais recentes avanços sobre regulação e compreensão da função da Aox em plantas.



Arnhold-Schmitt et al., 2006 (modificado)

Figura 1 - Via da respiração alternativa da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial mostrando a localização de cada enzima. Em amarelo: NAD(P)H desidrogenase interna e externa, em verde: oxidase alternativa.

1.1 Funções da Oxidase Alternativa

A atividade da AOX foi detectada em tecidos vegetais há mais de 100 anos, contudo, sua função era desconhecida e avanços significativos a esse respeito ocorreram apenas a partir dos anos 70. A primeira função sugerida para AOX, e talvez a mais aceita, estava relacionada com a produção de calor em inflorescências encontradas em plantas termogênicas da família Araceae com a finalidade de volatilizar compostos aromáticos das flores e atrair polinizadores (Meeuse, 1975). Contudo, em plantas ditas não-termogênicas a função da AOX permanece incerta apesar de inúmeros artigos sugerirem funções na prevenção de formação de radicais livres, manutenção do funcionamento do ciclo do ácido tricarbóxico e regulação celular em situações de estresse (MOORE et al., 2001).

De acordo com Moore e colaboradores (2001) a função biológica em plantas não termogênicas envolve: proteção celular contra danos oxidativos ou manutenção do ciclo de Krebs, mesmo quando há uma alta concentração de ATP celular. Os estudos para avaliar o envolvimento da AOX na prevenção de formação de EROs em plantas não termogênicas tem como marco o trabalho com plantas transgênicas de tabaco com linhagens super expressando e outra linhagem reprimindo a expressão da AOX (MAXWELL et al., 1999). Nesse trabalho avaliou-se que as plantas com expressão aumentada da AOX apresentaram quantidades menores de radicais livres. Além disso, nesse mesmo trabalho, enzimas antioxidantes tiveram seus transcritos diminuídos. Por outro lado, plantas mutantes de tabaco reprimindo a expressão da AOX mostraram quantidades maiores de radicais livres e elevados níveis de transcritos de enzimas antioxidantes como: superóxido desmutase (SOD) (MAXWELL et al., 1999). Outro papel para AOX abrange a integração entre o metabolismo do carbono e a respiração nas condições desfavoráveis a célula, onde a Aox mantém o ciclo do ácido tricarbóxico funcionando para que ácidos orgânicos intermediários desse ciclo sejam exportados para outras vias metabólicas com o intuito de levar a homeostase celular (VANLERBERGHE e MCINTOSH, 1997; MCKANZE e MCINTOSH, 1999).

Atualmente, com os diversos resultados oriundos de estudos de expressão gênica e protéica da Oxidase Alternativa em resposta a condições de estresses foi sugerido que uma das possíveis funções da AOX é regular o metabolismo celular em situações de estresses. (ARNHOLDT-SCHMITT et al., 2006; VAN AKEN et al., 2009; ZHANG et al., 2009). Para determinar tal função foi verificada que plantas mutantes sem atividade Aox são afetadas com grande quantidades de EROs e que levam a um desequilíbrio no sistema antioxidante e que essas plantas mutantes não podem reajustar as condições normais (WATANABE et al., 2008; GIRAUDL et al., 2008; VANLERBERGHE et al., 2009). Além disso, outras evidências

descritas por Van Aken e colaboradores (2009) suportam essa idéia da AOX como um regulador de estresse celular, destacando: (i) AOX é o ponto inicial de uma complexa cascata de sinalização em resposta ao desequilíbrio celular e (ii) Aox atua como um controle no qual determina o limiar para a indução da morte celular programada.

1.2 Família multigênica e organização no genoma da Oxidase Alternativa

Em plantas, oxidase alternativa é composta por uma família multigênica codificada pelo DNA genômico e importada para mitocôndria (TANUDJI et al., 1999). Atualmente se sabe que a oxidase alternativa é codificada por três a cinco genes, contudo, inicialmente acreditava-se que a AOX era codificada por um único gene. A obtenção de anticorpos monoclonais a partir da AOX de flores da planta termogênica *Sauromatum guttatum* por Elthon et al., (1989) viabilizou o isolamento do primeiro cDNA de AOX a partir de uma biblioteca de cDNA de *Saromatum guttatum* por Rhoads e McIntosh (1991). A partir de seqüências de cDNAs foi possível desenhar primers degenerados e famílias multigênicas foram caracterizadas em várias espécies de plantas aumentando de forma drástica dados de seqüências da Aox depositadas em bancos de dados (WHELAN et al., 1996; ITO et al., 1997; SAISHO et al., 1997; KARPOVA et al., 2002; HOLTZAPFFEL et al., 2003; COSTA et al., 2009). Considine e colaboradores (2002) propuseram uma distribuição dos genes da Aox em duas subfamílias: Aox tipo 1 encontrada tanto nos grupos das Eudicotiledôneas quanto Monocotiledôneas, enquanto que a subfamília Aox tipo 2 é exclusiva das Eudicotiledôneas. Até 2009, a caracterização de genes da AOX tinha tido como foco as Angiospermas, quando um estudo na espécie *Pinus pinea* (Gimnosperma) também revelou a presença de ambas as subfamílias da Aox (FREDERICO et al., 2009). Esse estudo é interessante, pois fornece novos dados a respeito da história evolucionária da Aox sugerindo que a subfamília Aox2 (ausente em monocotiledôneas) existe em plantas superiores antes do surgimento das Angiospermas. Além disso, sugere-se que durante os eventos de segregação e diversificação das Angiospermas, o clado Monocotiledôneas perdeu a subfamília Aox2.

Em relação ao padrão de duplicação dos genes de Aox, a maioria das espécies estudadas até o momento mostram um perfil de duplicação dos genes Aox tipo 1 semelhante aquele encontrado em *Arabidopsis thaliana*. Esta espécie apresenta cinco genes Aox sendo quatro do tipo Aox1 (Aox1a, 1b, 1c e 1d) e somente um gene Aox2. Por outro lado, um padrão distinto daquele de *Arabidopsis thaliana* tem sido encontrado na ordem Fabales, família Fabaceae mostrando apenas um gene Aox1 e dois genes Aox tipo 2 (Aox2a e 2b) (WHELAN et al., 1996; COSTA et al., 2004; COSTA et al., 2007; COSTA et al., 2010), bem

como em *Daucus carota* mostrando duplicação de ambas as subfamílias (DcAox1a, DcAox1b, DcAox2a e DcAox2b) (COSTA et al., 2009a).

Quanto à organização dos genes no genoma nuclear, sabe-se que a estrutura exon/intron dos genes Aox é bastante conservada apresentando quatro exons e três introns (Figura 02A). Contudo, alguns casos mostram uma arquitetura do gene Aox alterada devido a processos de deleção ou inserção de um exon ou intron, como Aox1d e Aox2 de *Arabidopsis thaliana*, Aox1b de *Oriza sativa* ou Aox1a de *Solanum tuberosum* (CONSIDINE et al., 2002; POLIDOROS et al., 2009) (Figura 02B). Além disso, a distribuição dos genes no genoma nuclear é pouco conhecida, mas em espécies como *Arabidopsis thaliana* a disposição dos genes no genoma é conhecida pelo sequenciamento total do genoma. Dessa forma, AtAox1a, AtAox1b e AtAox1c estão localizados no cromossomo três sendo que AtAox1b e 1a estão próximos separados por cerca de 1500 pb (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000; CLIFTON et al., 2006). De maneira semelhante os genes Aox2b e 2a de soja também estão próximos no mesmo cromossomo enquanto GmAox1 está presente em outro cromossomo (THIRKETTLE-WATTS et al., 2003). Esse arranjo em “tandem” (um após outro) aparece também em arroz no qual OsAox1b e OsAox1a estão seguidos no mesmo cromossomo (ITO et al., 1997).

1.3 Expressão gênica da Oxidase Alternativa

O grande número de isoformas da Aox em plantas tem levado a questionamentos a respeito do papel que cada um dos membros da Aox possui no metabolismo celular. O estudo realizado por Considine e colaboradores (2002) de separação dos diversos genes da Aox em duas subfamílias trouxe outras implicações importantes em relação ao padrão de expressão gênica: foi sugerido que os genes da subfamília Aox1 são expressos em resposta a estresses enquanto os genes da subfamília Aox2 são expressos de maneira constitutiva ou relacionados a tecidos fotossintetizantes.

Estrutura conservada		
Espécie	Gene	Referência
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Aox1a, Aox1b, Aox1c</i>	(Considine et al., 2002)
<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Aox</i>	<i>GenBank Acc. No.</i> AB055060
<i>Citrus sinensis</i>	<i>Aox1a</i>	<i>GenBank Acc. No.</i> EU723698
<i>Glycine max</i>	<i>Aox1, Aox2a, Aox2b</i>	(Thirkettle-Watts et al., 2003)
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Aox1</i>	(Li et al., 2008)
<i>Oryza sativa</i>	<i>Aox1a, Aox1c, Aox1d</i>	(Considine et al., 2002)
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Waox1a, Waox1c</i>	(Takumi et al., 2002)
<i>Vigna unguiculata</i>	<i>Aox1</i>	<i>GenBank Acc. No.</i> DQ100440
<i>Vitis vinifera</i>	<i>Aox1a, Aox2</i>	(Velasco et al., 2007)
<i>Zea mays</i>	<i>Aox1a</i>	(Polidoros et al., 2005)
Ganho de um introns e exon		
Espécie	Gene	Referência
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Aox2</i>	(Considine et al., 2002)
Perda do intron 2		
Espécie	Gene	Referência
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Aox1d</i>	(Considine et al., 2002)
<i>Oryza sativa</i>	<i>Aox1b</i>	(Considine et al., 2002)
Perda do intron 3		

Polidoros et al., 2009 (modificado)

Figura 2 - Organização exon/intron dos genes da Aox em plantas. (A) Estrutura exon/intron da Aox encontrada na maioria das espécies de plantas. (B) Adição ou remoção de exon e/ou intron na estrutura dos genes da Aox.

Após a publicação em 2002 por Considine e colaboradores, muitos dados a respeito da expressão dos genes Aox, aqui em especial Aox2, foram descritos. Tem sido proposto para Aox2 de *Arabidopsis* um papel na comunicação entre mitocôndria e cloroplasto mediado pela presença de cisteína ao invés de funcionar apenas como um gene de expressão basal como foi proposto para isoforma tipo 2 (CONSIDINE et al., 2002; CLIFTON et al., 2005). Além disso, novas evidências apontam para a indução dos genes Aox2 em resposta a estresses ambientais contrariando os dados obtidos por Considine e colaboradores (2002). Inicialmente, estudos em raízes de *Vigna unguiculata* mostraram uma regulação diferencial do gene VuAox2b em resposta a estresse osmótico (COSTA et al., 2007) posteriormente, em *Glycine max* um aumento da expressão do gene GmAox2b junto com GmAox1 em resposta a ácido salicílico foi observado (MATOS et al., 2009) e recentemente, um estudo em folhas de *Vigna unguiculata* revelou, de forma mais clara, que o gene VuAox2b é co-expresso com VuAox1 em resposta a várias condições de estresse abiótico como ácido salicílico, estresse osmótico e peróxido de hidrogênio (COSTA et al., 2010).

Seria de esperar que genes ortólogos tendessem a ser expressos/regulados de maneira semelhante, contudo, para a AOX isso parece não ocorrer. Vários relatados na literatura mostram que espécies próximas filogeneticamente, na qual tem um estudo aprofundado sobre AOX, não apresentam um padrão de resposta semelhante quando aplicado as mesmas situações de crescimento ou estresse (MATOS et al., 2009; POLIDOROS et al., 2009; COSTA et al., 2010). Exemplos no qual fogem essa regra podem ser facilmente encontrado como: em condições de baixas temperaturas estimulam a transcrição de Aox em *Phaseolus radiatus*, mas o mesmo não ocorre em soja (GONZALEZ-MELLER et al., 1999).

Outro fator associado à expressão gênica é a relação do tamanho dos genes (tempo x gasto energético). Teorias, como “seleção econômica” e “economia de tempo” associando genes com introns pequenos e elevada expressão gênica foram sugeridas (CHEN et al., 2005). A transcrição é um processo lento (20 nucleotídeos/segundo) e com um gasto energético muito elevado para a célula, sendo necessários 2 ATPs para cada nucleotídeo adicionado (CASTILLO-DAVIS et al., 2002). Dois modelos opostos foram encontrados relacionando Aox com eficiência de gasto de energia x tempo. Um estudo *in silico* em genes da oxidase alternativa de *Vitis vinifera* mostrou que VvAox2 é pelo menos 4 vezes maior do que os genes Aox1, mas mesmo assim é o gene expresso de maneira constitutiva em todos os tecidos da planta (muita energia/muito tempo) (COSTA et al., 2009). Já em *Vigna unguiculata*, os genes VuAox1 e VuAox2b, possuem os menores tamanhos em relação a maioria dos genes Aox e são co-expressos e responsivos a estresses (menos energia / menos tempo) (COSTA et

al., 2010). Dessa forma, oxidase alternativa se torna um modelo atrativo para se estudar o desenho e organização do genoma (COSTA et al., 2009).

Atualmente, a pesquisa sobre a Aox tem sido direcionada para estudos de co-regulação da Aox com outros genes do metabolismo mitocondrial e mesmo celular em resposta a estresses (CLIFTON et al., 2006). Experimentos com *Arabidopsis* submetida a 219 agentes estressantes revelou, por RT-qPCR, que no âmbito mitocondrial Aox é co-expressa com outros componentes da via alternativa como: NAD(P)H desidrogenase externa (NDB) e interna (NDA) (ELHAFEZ et al., 2005; CLIFTON et al., 2006). Em um contexto celular mais amplo, foi verificado uma expressão similar entre os genes da AtAox, principalmente AtAox1a, como vários genes de enzimas do sistema antioxidante sugerindo assim que a resposta da Aox é somente uma parte de uma complexa resposta ao estresse (GLOMBITZA et al., 2004; APEL e HIRT et al., 2004; CLIFTON et al 2006).

1.4 Regulação da expressão gênica da oxidase alternativa

Por ser uma enzima de rapidamente expressa em uma grande variedade de estresses ambientais e ser um produto gênico oriundo de apenas uma cadeia polipeptídica, foi sugerido que a oxidase alternativa é um bom modelo para o estudo do sistema de regulação retrograda mitocondrial entre mitocôndria e núcleo (MCINTOSH et al., 1998). Por esse motivo, estudos investigaram os mecanismos e as vias de regulação da expressão dos genes Aox. O papel proposto para AOX, por Maxwell e colaboradores (1999), sugere que esta enzima pertence a um sistema de proteínas antioxidantes ativadas por espécies reativas de oxigênio. Este papel proposto foi corroborado por outros trabalhos em diversas plantas, tal como milho onde há um aumento na quantidade da proteína ou de transcritos da Aox em resposta a condições que elevaram a concentração de EROs celular (POLIDOROS et al., 2005). De maneira semelhante, estudos com cultura de células de soja submetidas a vários estresses mostraram aumento dos transcritos do gene Aox1 na presença de agentes químicos que aumentam a concentração de EROs celular. Contudo, na presença de citrato, um agente que não aumenta a concentração de EROS celular, evidenciou-se o acúmulo de mRNA Aox1 em soja (DJAJANERA et al., 2002). Este resultado sugeriu a presença de duas vias de regulação da expressão gênica: uma via dependente de EROs e outra não dependente. Os resultados mostrados por Djajanera et al (2002) foram corroborados por Gray et al (2004) usando cultura de células de tabaco. Nesse estudo com tabaco, duas vias de sinalização da expressão da oxidase alternativa semelhantes ao encontrado em soja foram propostas. Além disso,

identificou-se que outros intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, como α -cetoglutarato, são, também, sinalizadores da regulação gênica da Aox.

O ponto chave do controle da expressão gênica são os promotores. Por isso, estudos de regulação gênica da Aox tem se concentrado nessa região do DNA. Um modelo usado para estudos de promotores dos genes Aox foi a região promotora do gene Aox1a de *Arabidopsis thaliana* (AtAox1a), pois este gene responde rapidamente e mais intensamente a fatores que causem disfunções mitocondriais (DOJCINOVIC et al., 2005; CLIFTON et al., 2005; CLIFTON et al., 2006). A fim de elucidar os motivos do comportamento de expressão deste gene, deleções no promotor AtAox1a foram realizadas e evidenciaram a presença de uma região de 93 pares de bases que regula e maximiza a expressão gênica pelos dois mecanismos de sinalização propostos por Djajanera et al (2002) e Gray et al (2004) por compartilhar elementos regulatórios comuns a estes dois mecanismos, sugerindo a importância dessa região no sistema de regulação retrograda mitocondrial (DOJCINOVIC et al., 2005).

Na busca por um maior entendimento do controle da expressão dos genes Aox, muitos pesquisadores tem utilizado como modelos promotores de soja e *Arabidopsis* através de estudos de deleção e mutação desses promotores (THIRKETTLE-WATTS et al., 2003; HO et al., 2007). Esses trabalhos trouxeram resultados interessantes mostrando que há uma divergência na resposta gênica em genes ortólogos (como descrito no tópico anterior): onde GmAox2a e GmAox2b tem perfis de expressão mais semelhantes com AtAox1a do que com AtAox2. Por fim, tais resultados levam a conclusão que não se deve assumir que genes ortólogos (em plantas diferentes) tenham o mesmo tipo de regulação da expressão gênica. Tal conclusão é semelhante à encontrada por Costa e colaboradores (2010) em *Vigna unguiculata* onde se sugere que co-expressão induzida por estresse de VuAox1 e VuAox2b tem uma regulação dependente de promotores diferentes daquela encontrada para Aox1a de *Arabidopsis*.

1.5 *Medicago sativa* L.

A planta escolhida para estudo da expressão dos genes da Aox foi a *Medicago sativa*. A etapa inicial desse trabalho foi realizada pela disponibilidade do genoma sequenciado de *Medicago truncatula* depositado no servidor Phytozome (<http://www.phytozome.net/cgi-bin/gbrowse/medicago>) e pela grande disponibilidade de dados de EST (aproximadamente 270.000 seqüências) depositadas no genBank. No genoma de *Medicago truncatula* foram retirados e anotados os genes Aox. Nessa busca, achou-se 4 membros da família multigenica da Aox, sendo que pela primeira vez foi achado uma

duplicação do gene Aox2b em: Aox2b1 e Aox2b2. Essa descoberta nos levou a buscar uma razão pelo qual em *Medicago truncatula* houve a duplicação desse gene. Contudo, a disponibilidade no Brasil de sementes do gênero *Medicago* é restrito a espécie *Medicago sativa*, cultivar crioula. Por esse motivo, usamos *Medicago sativa* como modelo experimental onde encontramos um padrão na distribuição dos genes Aox semelhante ao visto em *Medicago truncatula*.

A localização da origem da *Medicago sativa* não é uma certeza entre os sistematas vegetais, mas é sugerido que esta espécie originou-se na costa Nordeste do Mediterrâneo (LESINS E LESINS, 1979). Em relação a taxonomia, *Medicago sativa* pertence a Ordem das Fabales, Família Fabaceae, juntamente outros gêneros como *Vigna*, *Phaseolus*, *Glycine*.

A alfafa, *Medicago sativa* L., é considerada a primeira planta forrageira domesticada, e umas das mais importantes da atualidade. Geralmente, relaciona-se *Medicago sativa* com uma planta de clima temperado pelo fato de enorme capacidade de adaptação e produção em condições severas, como frio e baixa umidade (EMBRAPA, 2008). No Brasil, *Medicago sativa* foi introduzida no Rio Grande do Sul por imigrantes europeus e/ou argentinos nos meados do século XIX (SAIBRO, 1985). Alfafa tem sua importância econômica diretamente relacionada a alta produtividade e valor nutritivo e por ser considerada uma forma de alimentação mais adequada para pecuária bovina na forma de fenação ou pastagem (VIANA et al., 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar a família multigênica da oxidase alternativa em plantas do gênero *Medicago* (*M. truncatula* e *M. sativa*) e avaliar o efeito de estresses ambientais na expressão dos genes membros da família multigênica em *M. sativa*.

2.2. Objetivos específicos

1. Identificar e caracterizar a família multigênica da oxidase alternativa em *Medicago truncatula* através de buscas em bancos de dados genômicos e de cDNAs específicos;
2. Clonar, seqüenciar e identificar a família multigênica da oxidase alternativa em *Medicago sativa*;
3. Determinar a resposta da expressão gênica dos genes da oxidase alternativa de *M. sativa* durante as horas iniciais da germinação das sementes;
4. Avaliar o efeito de estresses abióticos na expressão gênica dos genes de oxidase alternativa de *Medicago sativa* em diferentes tecidos: foliar e radicular;
5. Clonar e seqüenciar os promotores dos genes de oxidase alternativa de *M. sativa* que são co-expressos e procurar por CARES (cis-acting regulatory elements) semelhantes entre os genes co-expressos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Identificação dos genes da Oxidase Alternativa (Aox) em plantas do gênero *Medicago*.

3.1.1. Busca dos genes da Oxidase Alternativa (Aox) no genoma de *Medicago truncatula* por análise *in silico*

As buscas por sequências da Aox em *Medicago truncatula* foram realizadas em bancos de dados específicos de origem genômica e de cDNAs usando a ferramenta BLAST (**Basic Local Alignment Search Tool**) e sequências da oxidase alternativa de *Vigna unguiculata* como molde. Os bancos de dados genômicos usados foram: genoma de *Medicago truncatula* parcialmente sequenciado disponível no servidor online phytozome (<http://www.phytozome.net/medicago.php>), sequências GSS (genomic survey sequences), HTGS (High throughput genomic sequences) e WGS (Whole-genome shotgun reads) disponíveis no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Já as sequências da Aox relativas a cDNAs foram obtidas através de buscas no banco de dados de EST (expressed sequence tag) de *Medicago truncatula* disponível do Genbank (269.238 sequencias).

As sequências de EST com identidade para Aox foram montadas gerando contigs usando a ferramenta de montagem de sequências CAP3 (Huang and Madan, 1999). As sequências genômicas foram anotadas da Aox *Medicago truncatula* e ou com cDNAs de outras espécies filogeneticamente próximas. Sequências de DNA e cDNAs (contigs) foram traduzidas em sequências de aminoácidos usando a ferramenta de tradução do servidor da web ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>http://www.infobiogen.fr/services/analyseseq/cgibin/traduc_in.pl).

3.1.2 Clonagem, e sequenciamento dos cDNAs da Aox de *Medicago sativa*

A partir dos genes da Aox identificados em *Medicago truncatula* desenhou-se pares de primers específicos (Tabela 01) para primeiramente amplificar e posteriormente analisar a expressão dos genes Aox de *Medicago sativa*.

Tabela 1: Primers usados para análises de expressão genica e clonagem parcial dos cDNAs de Aox de *M. sativa*.

Nome Primer	Sequência	Uso
Aox1Fwd	5' CTGGACAAGATGGCTTATTGG 3'	Estudo de expressão e clonagem Aox1
Aox1Rev	5' TGACAACCTCTACAACATCCC 3'	Estudo de expressão e clonagem Aox1
Aox2aFwd	5' CTGAATAAGCATCATGTGCCG 3'	Estudo de expressão e clonagem Aox2a
Aox2aRev	5' TACCGTGGAAGTGGATATCTG 3'	Estudo de expressão e clonagem Aox2a

Aox2b1Fwd	5' GGAAACTTGACTGGCAGAG 3'	Estudo de expressão e clonagem Aox2b1
Aox2b1Rev	5' CAGTGACTCAATGATAACCAAC 3'	Estudo de expressão e clonagem Aox2b1
Aox2b2Fwd	5' CTGGCAGAAGATGTCAACTC 3'	Estudo de expressão e clonagem Aox2b2
Aox2b2Rev	5' ACATCCTTAAGAGTTGCATCC 3'	Estudo de expressão e clonagem Aox2b2
pAox1Fwd	5' AGGGAATATTTTCAACAGATTTG 3'	Clonagem Aox1 promotor
pAox1Rev	5' CCAATAAGCCATCTTGTCAG 3'	Clonagem Aox1 promotor
pAox2b1Fwd	5' CGATAAACTAACCTAATTATAACAAATGAG 3'	Clonagem Aox2b1 promotor
pAox2b1Rev	5' CTCTGCCAGTACAAGTTTCC 3'	Clonagem Aox2b1 promotor
pAox2b2Fwd	5' AAAGAATTGAAAGAGGCTCC 3'	Clonagem Aox2b2 promotor
pAox2b2Rev	5' GAGTTGACATCTTCTGCCAG 3'	Clonagem Aox2b2 promotor

3.1.2.1. Amplificação dos produtos de RT-PCR para cada cDNA de MsAox

RNA total (2,0 µg) de folhas de plantas de *Medicago sativa* de 30 dias de idade, cultivadas em hidroponia foram utilizadas na reação de transcrição reversa para a síntese do cDNA através do kit Improm II (Promega, USA) seguindo as instruções do fabricante. A amplificação por RT-PCR para cada um dos quatro cDNAs da Aox foi feita utilizando os pares de primers específicos descritos na tabela 01 e seguindo programa de PCR, 40 ciclos com cada ciclo seguindo as etapas: (i) desnaturação 94 °C por 1 minuto, (ii) anelamento 55 °C por 1 minuto, (iii) extensão 72 °C por 35, 45, 30, 55 segundos para Aox1, Aox2a, MsAox2b1 e MsAox2b2, respectivamente.

3.1.2.2. Purificação e ligação dos produtos de RT-PCR

Os produtos amplificados de cada um dos cDNAs por RT-PCR foram aplicados a uma eletroforese em gel de agarose de 1,5%. Os produtos de RT-PCR de cada cDNA foram então cortados do gel e purificados usando o kit QIAEXII (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. A reação de ligação do produto de RT-PCR purificado ao vetor plasmídico foi realizada com o kit pGEM-Teasy (Promega, USA) de acordo com o fabricante. A ligação foi mediada pela ação da enzima T4 DNA ligase. A reação ocorreu a 4 °C durante 1 dia sendo o produto de ligação armazenado a -20 °C até a transformação das bactérias *Escherichia coli*, cepa, JM109.

3.1.2.3. Transformação de bactérias de *Escherichia coli* cepa JM109

A transformação consistiu da incorporação do plasmídio recombinante (vetor plasmídico contendo o produto de PCR) através do método do choque térmico. Bactérias de *Escherichia coli* foram cultivadas em 2 mL de meio LB (NaCl 1%; Peptona 1%; Extrato de

levedura 1,0%) a 37 °C sob agitação a 125 rpm por, aproximadamente, 16 horas. Feito isso, 100 µL da cultura foram transferidas para um erlemeyer de 125 mL contendo 10 mL de LB à 37 °C a 125 rpm durante, aproximadamente, 75 minutos. Em seguida, 1 mL da cultura foi usado em cada uma das quatro transformações com os diferentes produtos de ligação, Então, para isso, 1 ml da cultura foi submetido a uma centrifugação de 5000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 500 µL da solução I (KCl 10 mM; MOPS 10 mM) para lavagem, seguindo-se de nova centrifugação a 5000 rpm por 2 minutos e recuperação do precipitado. O precipitado foi ressuspense em 500 µL da solução II (KCl 10 mM; MOPS 10 mM; CaCl₂ 1 M) e incubado durante 15 minutos em contato com gelo, depois centrifugado nas mesmas condições anteriores. Contudo, foi retirado apenas 400 µL da solução II, pois nos 100 µL restantes as bactérias de *Escherichia coli* foram ressuspensas com bastante cuidado para não causar a destruição da célula devido a fragilidade da parede e membrana celular. Nesse momento, 5 µL de produto de ligação (de cada produto de RT-PCR purificado) foi adicionado. Mais uma vez, as bactérias foram incubadas em contato com gelo por, aproximadamente, 75 minutos. Passado esse tempo, as bactérias foram submetidas a um choque térmico, contato com gelo por 1 minuto, seguido de banho-maria à 42 °C por 1 minutos e, imediatamente, recolocadas em contato com gelo por mais 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1000 µL de LB aos aproximadamente 100 uL de solução com bactérias. Assim, 1100 µL da cultura foram incubadas à 37 °C a 125 rpm por 90 minutos antes da última centrifugação a 5000 rpm por 2 minutos. No final, 1000 µL do sobrenadante foram descartados e o precipitado contendo as bactérias foi ressuspensos nos 100 µL restantes. A cultura de bactérias foi espalhada em meio LB ágar (contendo X-Gal 2%; IPTG 50 mM; carbenicilina 100 µg/mL) e incubada à 37 °C por, aproximadamente, 24 horas. O resultado foi mostrado em colônias brancas e azuis: as brancas sendo as positivas (contém o vetor de ligação adicionado do produto de RT-PCR) e azuis negativas. As colônias positivas foram avaliadas por PCR utilizadno DNA das bactérias, específico plasmídeo inserido, para verificar o sucesso da transformação.

3.1.2.4. Validação da transformação de *Escherichia coli* através de PCR

10 colônias brancas para cada produto de RT-PCR a ser sequenciado foram escolhidas. Uma amostra de cada colônia foi coletada através do toque com um palito de madeira estéril na colônia e transferida para 50 µL de água mili-q para causar plasmólise e liberar o material genético da bactéria. Uma pequena quantidade dessa amostra foi utilizada

para realizar a PCR usando para isso primers universais M13F (senso) e M13R (reverso) que são específicos para o vetor plasmídico utilizado, pGEMT-easy, anelando-se na região adjacente ao local de inserção dos produtos de RT-PCR. Em todas as colônias testadas, a transformação foi confirmada.

3.1.2.5. Extração de DNA plasmidial: mini preparação

As colônias foram tocadas com um palito de madeira estéril e uma pequena amostra foi transferida para 10 mL de meio TB (Tryptona 1,2%; Extrato de Levedura 2,4%; Glicerol 0,4%; KH_2PO_4 0,038%; K_2HPO_4 0,21%) contendo 10 μL de carbenicilina (50 mg/mL) no qual foi incubado a 37 °C durante a noite, aproximadamente 16 horas, sob agitação constante de 125 rpm. No dia seguinte, retirou-se 1,5 mL de cada recipiente e centrifugou-se por 2 minutos a 5000 rpm em um tubo de 2,0 mL. Cuidadosamente o sobrenadante foi descartado enquanto o precipitado foi ressuspensão com 200 μL da solução I (Tris 25 mM pH 8; EDTA 10 mM) agitando-se vigorosamente. Feito isso, adicionou-se 300 μL da solução II (NaOH 0,2 N; SDS 1 %; solução preparada instantes antes do uso) deixando o tubo em repouso durante 5 minutos a temperatura ambiente. A seguir, adicionou-se a solução III (Acetato de potássio 3 M pH 7,2), agitou-se o tubo usando um “vortex” e centrifugou-se a mistura a 13000 rpm por 10 minutos à 4 °C. Dessa vez o sobrenadante foi aproveitado e transferido para um novo tubo eppendorf estéril de 2,0 mL ao qual foi adicionado 1 volume de solução de fenol/clorofórmio (1:1) e, por inversão, misturou-se as fases orgânica e aquosa. A seguir, as fases foram separadas por centrifugação e a fase aquosa foi recuperada. A esta foi adicionado 1 volume de isopropanol 100% a -20 °C e centrifugada a 13200 rpm por 10 minutos a 4 °C para precipitação dos plasmídios presentes na fase aquosa da extração. O precipitado foi lavado com 500 μL de álcool etílico 80%, o sobrenadante foi desprezado e o tubo foi invertido com cuidado para secar. O precipitado foi dissolvido em 32 μL de água mili-q contendo RNase 100 $\mu\text{g/mL}$. A solução foi incubada a 37 °C por 20 minutos em um banho-maria e em seguida foi adicionado 8 μL de NaCl 4M e 40 μL de PEG 8000 13% deixando-se o tubo em repouso por mais 20 minutos no gelo.

Enfim, os plasmídios foram precipitados através de uma nova centrifugação a 11500 rpm por 15 minutos à 4 °C. O precipitado foi recuperado e lavado com etanol frio 80% no passo seguinte. Centrifugou-se novamente a 13200 rpm por 5 minutos à 4 °C, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensão em 20 μL de água milli-q estéril.

3.1.2.6. Seqüenciamento e análise de bioinformática

Os clones selecionados foram seqüenciados na Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP/Botucatu). As seqüências nucleotídicas geradas pelo seqüenciamento foram comparadas entre si usando a ferramenta de alinhamento global online ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (Thompson et al., 1997). Após a identificação dos distintos cDNAs de Aox de *Medicago sativa*, foram realizadas buscas no banco de dados de nucleotídeos do NCBI (National Center of Biotechnology Information) por seqüências de alta similaridade usando a ferramenta Blastn (Basic Local Aligment Search Tool) para cada um dos cDNAs de Aox identificados. Outro passo para avaliação do seqüenciamento foi a tradução dos nucleotídeos seqüenciados de cada cDNA de Aox identificados usando a ferramenta online translate no servidor ExPASy (<http://expasy.org/tools/dna.html>).

3.1.2.7. Construção de árvore filogenética da Aox

A árvore filogenética da Aox foi construída a partir de 15 seqüências de aminoácidos deduzidas, da Ordem Fabales, depositadas em bancos de dados públicos além de quatro seqüências de aminoácidos deduzidas de Aox encontradas no genoma de *Medicago truncatula* e três seqüências de aminoácidos deduzidas de Aox seqüenciadas a partir do cDNA de *Medicago sativa*. A família Aox (1a, 1b, 1c, 1d e 2) de *Arabidopsis thaliana* foi escolhida como grupo externo uma vez que pertence a outro clado (Brassicaceae) e tem gene Aox bem anotados. O alinhamento e construção da árvore filogenética da Aox foi feita usando o programa MEGA5.

3.2. Estudos da expressão dos genes da Aox em *Medicago sativa*

3.2.1. Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de *Medicago sativa* cultivar crioula foram obtidas pela empresa Real Sementes (Paraná, Brasil). As sementes foram usadas para dois experimentos distintos. O primeiro experimento consistiu na análise da expressão dos genes da Aox durante o desenvolvimento inicial das sementes: estas foram postas para germinar em placa de Petri autoclavadas contendo papel de filtro umedecidos. As sementes em desenvolvimento nos tempos de 0, 24 e 48 horas após semeadura foram coletas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80 °C para posterior extração de RNA total e análise de expressão RT-PCR.

Para o segundo experimento, sementes foram postas para germinar em areia de rio estéril em casa de vegetação durante 12 dias, depois disso, as plântulas foram transferidas para hidroponia contendo meio de Hoagland (KNO_3 1 M; MgSO_4 1 M; $\text{K}(\text{NO}_3)_2$ 1 M; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1 M and Fe-EDTA 0,5%) com micro elementos (H_3BO_3 2,86 gL^{-1} , MnCl_2 1,86 gL^{-1} , ZnSO_4 0,22 gL^{-1} , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,08 gL^{-1} and Na_2MoO_4 0,20 gL^{-1}) na qual ficaram durante 18 dias até a aplicação dos estresses abióticos: H_2O_2 10 mM, PEG 100,37 gL^{-1} , Cisteína 1 mM (aplicação nas raízes) e Ácido Salicílico 0,5 mM (aplicado nas folhas). Folhas e raízes de no mínimo 5 plantas nos tempo de 0, 6, 12 e 24 horas foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80°C para posterior extração de RNA total e expressão por RT-PCR.

3.2.2. Extração de RNA total de diferentes tecidos de Medicago sativa. Extração, quantificação e pureza do RNA total

Os RNAs utilizados nesse trabalho foram extraídos usando o RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. O material vegetal (folha e raiz) foram maceradas em nitrogênio líquido até a formação de um pó bastante fino. O macerado foi transferido para um tubo de 1,5 mL contendo tampão RLT acrescentado de β -mercaptoetanol e, então, agitado vigorosamente em vortex. O homogeneizado foi transferido para a coluna QIAshredder spin e centrifugado por 2 minutos a 13000 rpm. O material filtrado foi recuperado e posto em um novo tubo de 1,5 mL e adicionado 0,5 volume de etanol (96-100%). A amostra foi transferida para uma nova coluna, RNeasy spin, e centrifugado por 20 segundos a 10000 rpm. Nessa etapa, a amostra contendo RNA total está ligada a membrana da coluna. Tampão RW1 é adicionado a coluna (RNeasy spin) e centrifugado por 20 segundos a 10000 rpm. O filtrado é descartado. Duas lavagens com tampão RPE são realizadas: a primeira foi centrifugada por 20 segundos a 10000 rpm enquanto a segunda foi centrifugada por 2 minutos a 13000 rpm para remoção total de etanol. Por fim, o RNA retido na coluna foi eluído com adição de 30 μL de água mili-q DEPC centrifugando a amostra por 1 minutos a 13000 rpm.

A quantificação e verificação da pureza dos RNAs foi realizada por medidas de absorvância em 230, 260 e 280nm cujas relações $^{260}/_{230}$ na qual devem ser superiores a 2,0 e $^{260}/_{280}$ na qual devem ficar no intervalo entre 1,7 e 2,0 (Sambrook et al., 1989; Udvardi et al., 2008). Já a integridade dos RNAs totais foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1,0% revelado com solução de brometo de etídio. A concentração do RNA total isolado foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$[\text{RNA}] = 40\mu\text{g/mL} \times \text{Diluição da amostra} \times \text{Absorbância } 260\text{nm}$$

3.2.3. Síntese da primeira fita de cDNA e reações de PCR

A síntese do cDNA foi realizada pelo kit ImpromII™ Transcriptase Reverse (Promega, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante utilizando 2,0µg de RNA total e oligodT₂₄ como iniciador para reação de transcrição reversa. A amplificação dos diferentes genes da Aox foi realizada pela reação em cadeia da DNA polimerase (PCR sigla em inglês) utilizando o sistema GoTaq® DNA Polimerase (Promega, Estados Unidos) e pares de primers específicos para cada gene Aox descritos na tabela 01. Os resultados das RT-PCR semi quantitativas foram visualizado em gel de agarose de 1,2% e corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL.

3.3. Estudos in silico dos promotores dos genes da Aox no gênero *Medicago*

3.3.1. Extração de DNA genômico e clonagem dos promotores de *Medicago sativa*

A extração do DNA genômico de plantas de 45 dias de idade de *Medicago sativa* foi realizada pelo método CTAB a partir do tecido foliar. Folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e depois posta em contato com 3,0mL de tampão CTAB 2x (CTAB 2%; Tris-HCl 100mM pH 8; EDTA 20mM; NaCl 1,4M) pré-aquecido a 65 °C. O recipiente contendo o material macerado foi agitado suavemente por inversão até obtenção de uma mistura homogênea. Em seguida, o homogeneizado foi posto em um banho-maria à 65 °C por 30 minutos agitando-se a cada 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 3,0mL de uma mistura clorofórmio/álcool isoamílico na proporção (24:1 v/v). O tubo foi agitado por inversão durante 10 minutos e submetido a uma centrifugação de 5000rpm por 10 minutos para extração e separação das fases aquosa e orgânica. A fase superior da mistura (fase aquosa) foi reaproveitada e adicionada uma solução de Ribonuclease A (50µg/mL). O tubo foi posto em banho-maria por 20 minutos a 37 °C para eliminação de RNA contaminante. Após a digestão do RNA foi adicionado ao tubo 0,6 volume de isopropanol (-20 °C) para precipitarDNA. O tubo foi centrifugado a 5000rpm por 30 minutos à 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado (DNA) foi dissolvido em 200µL de tampão água mili-q e armazenado em um freezer a temperatura de -20 °C.

A quantificação e pureza do DNA isolado foram realizadas por medidas de absorbância em 230, 260 e 280nm cujas relações $^{260}/_{230}$ na qual devem ser superiores a 2,0 e $^{260}/_{280}$ na qual devem ficar no intervalo entre 1,7 e 2,0 (SAMBROOK et al., 1989; UDVARDI et al., 2008). Já a integridade do DNA genômico foi realizada através de eletroforese em gel

de agarose 1,0% revelado com solução de brometo de etídio. A concentração do DNA genômico isolado foi determinado de acordo com a seguinte equação:

$$[\text{DNA}] = 50\mu\text{g/mL} \times \text{Diluição da amostra} \times \text{Absorbância } 260\text{nm}$$

O DNA genômico foi utilizado como molde para amplificação e clonagem dos promotores dos genes MsAox1, MsAox2b1 e MsAox2b2. Pares de primers específicos para os promotores daqueles genes são descritos na tabela 01. As reações de PCR para cada fragmento genômico foram feitas em 50 ciclos cada um: é descrito como: 94 °C por 60 segundos, 57,2 °C por 60 segundos, 72 °C por 80 segundos.

Os fragmentos correspondendo aos tres promotores foram purificados, clonados e seqüenciados da mesma maneira citada acima nos materiais e métodos para os cDNAs da Aox de *Medicago sativa*.

3.3.2. Análises e predição dos elementos funcionais nas regiões promotoras dos genes Aox1 e Aox2b1 de *Medicago sativa*

Os pares de primers usados para clonagem dos promotores de *Medicago sativa* (tabela 1) amplificaram uma região do promotor mais uma porção da região 5' do gene Aox para que possamos saber se realmente o promotor seqüenciado era do gene Aox e de qual das isoformas. Para isso usamos programas de bioinformática online foram usados para determinar os sítios de transcrição e de tradução das seqüências de DNA genômico correspondendo aos promotores clonados dos genes Aox co-expressos (MsAox1, MsAox2b1 e MsAox2b2). O possível local de transcrição foi determinado com o auxílio do programa ProScan (<http://thr.cit.nih.gov/molbio/proscan/>). Além disso, um alinhamento global realizado com o software clustalw entre as seqüências obtidas nesse trabalho e as seqüências anotadas dos genes Aox de *Medicago truncatula* ajudou a determinar o local inicial de transcrição dos genes. Para a localização do códon de iniciação foi utilizado o programa NetStart (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetStart/>).

Um alinhamento local foi realizado usando a ferramenta Blast para encontrar possíveis regiões promotoras comuns entre os genes Aox1 e Aox2b1 de *Medicago sativa*. Além disso, nos bancos de dados uma busca por elementos regulatórios cis na região de promotor foi realizada pelos softwares: PLACE e plantCARE (Higo et al., 1999; Lescot et al., 2002).

4. RESULTADOS

4.1. Anotação dos genes Aox de *Medicago truncatula*, clonagem dos cDNAs da Aox de *Medicago sativa* e análise filogenética

Quatro sequencias no genoma de *M. truncatula* foram retirados e identificados como sendo genes Aox. Após analisados, essas sequencias foram anotadas como Aox1, Aox2a, Aox2b1 e Aox2b2 (pela primeira vez encontrando uma duplicação do gene Aox2b divididos em dois genes parálogos). Foi possível localizar os genes Aox1 e ambos Aox2b (2b1 e 2b2) no genoma de *M. truncatula* mostrando que estes encontrem-se presentes no mesmo cromossomo e que genes Aox2b estão em tandem, Aox2b1 seguido de Aox2b2 (Figura 3). Até o momento, as plantas com genoma seqüenciado e genes Aox caracterizados e/ou anotados apresentam genes Aox1 e Aox2 sempre em cromossomos diferentes (Tabela 02). Não foi possível localizar os gene Aox2a no genoma de *M.truncatula*, pois o genoma não está completamente seqüenciado, assim Aox2a foi caracterizado por busca em bancos de EST.

Tabela 02. Plantas com genoma seqüenciado e a localização dos genes Aox em cada cromossomo.

Genes							
Espécie	Aox1(a)	Aox1b	Aox1c	Aox1d	Aox2(a)	Aox2b(1)	Aox2b2
<i>Medicago truncatula</i>	Cro 5				?	Cro 5	Cro 5
<i>Glycine max</i>	Cro 4				Cro 8	Cro 8	
<i>Lotus japonicus</i>	Cro 2				Cro 4	Cro 4	
<i>Prunus persica</i>	Scf 5				Scf 1	Scf 1	
<i>Populus trichocarpa</i>	Cro 15	Cro 12	Cro 12	Cro 3			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cro 3	Cro 3	Cro 3	Cro 1	Cro 5		
<i>Carica papaya</i>	Cro 6				Cro 3		
<i>Eucalyptus grandis</i>	Scf 5			Scf 5	Scf 9		
<i>Vitis vinifera</i>	Cro 2			Cro 2	Cro 12		
<i>Mimulus guttatus</i>	Scf 267			Scf 36	Scf 164		
<i>Solanum lycopersicum</i>	Cro 8		Cro 8	Cro 8	?		
<i>Solanum tuberosum</i>	Scf 683		Scf 341	Scf 683	Scf 136		

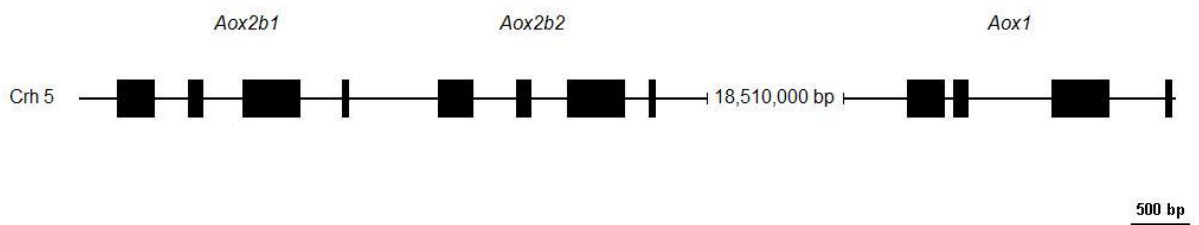


Figura 03 - Localização dos genes no cromossomo 5 de *Medicago truncatula*.

Os genes da família multigênica da Aox, no qual foram determinados a posição no DNA genômico (Aox1, Aox2b1 e Aox2b2) de *Medicago truncatula* possuem o 4 exons e 3 codificando para cadeias polipeptídicas de 330, 345, 324 e 323 aminoácidos. Estas 4 sequencias de proteínas Aox de *Medicago truncatula* mostraram semelhança variando entre 54 a 89% (Tabela 03) (Figura 04). Comparada com as sequencias de proteínas deduzidas de *Vigna unguiculata* (Família Fabaceae, mesma de *Medicago truncatula*) observou-se uma semelhança entre Aox de *Medicago truncatula*/*Vigna unguiculata* de: MtAox1/VuAox1 79%, MtAox2a/VuAox2a 81%, MtAox2b1/VuAox2b 82%, MtAox2b2/VuAox2b 82%. Contudo, os genes duplicados Aox2b, de *Medicago truncatula*, tem maior similaridade entre si (MtAox2b1/MtAox2b2 89%) do que com *Vigna unguiculata*.

Tabela 03. Comparação entre as quatro proteínas deduzidas de Aox retirados do genoma de *Medicago truncatula* realizado pelo alinhamento global das sequencias de aminoácidos deduzidos a partir do genes Aox de *Medicago truncatula* usando o software ClustalW.

	MtAox1	MtAox2a	MtAoxb1	MtAox2b2
MtAox2b2	56%	67%	89%	100%
MtAox2b1	54%	65%	100%	
MtAox2a	57%	100%		
MtAox1	100%			

O resultado da caracterização da família multigênica da Aox em *Medicago sativa*, a partir de cDNA e usando os pares primers específicos mostrados na tabela 1, revelou a presença de uma família semelhante aquela encontrada em *Medicago truncatula* (com exceção da Aox2b1 que não teve um bom seqüenciamento, então foi descartado para as análises. Um novo preparo dessa amostra para seqüenciar o fragmento de cDNA correspondendo a Aox2b1 está em andamento) (Figura 05). Fragmentos de 514, 573 e 597pb resultou em sequencias semelhantes Aox1, Aox2a e Aox2b2 em *Medicago sativa*, respectivamente (Figura 05). Um Blast realizado para cada seqüência nucleotídica seqüenciada parcialmente mostrou altas similaridades com outras seqüências depositadas no NCBI. MsAox1 apresentou 82%, 86% e 81% de similaridade com Aox tipo-1 de *Vigna unguiculata* (DQ100441.1), *Glycine max* (AF083880) e *Citrullus lanatus* (GU565957.1), respectivamente. MsAox2a apresentou 89%, e 87% de similaridade com Aox2a de *Glycine max* (U87906) e *Vigna unguiculata* (EF18746).

MsAox2b2 apresentou 83%, 82%, 83% e 74% com Aox tipo-2 de *Glycine Max* (Aox2b GMU87907), *Vigna unguiculata* (Aox2b AJ421015.1), *Arachis hypogaeae* (EZ752800.1) e *Vitis vinifera* (Aox2 XM_002274434.1), respectivamente.

As seqüências parciais de nucleotídeos seqüenciados para os cDNAs de Aox de *Medicago sativa* foram traduzidas em uma seqüência de aminoácidos deduzidas utilizando a ferramenta online translate do servidor expasy (Figura 05). A sequência de aminoácidos deduzidas para MsAox1, MsAox2a e MsAox2b2 foram de 169, 191 e 199 aminoácidos, respectivamente (Figura 06). Um alinhamento entre as sequências de aminoácidos deduzidas mostrou que semelhança entre as isoformas da família multigênica Aox de *Medicago sativa* varia de 65 a 80%

Figura 07 mostra o resultado da construção de uma árvore filogenética feita pelo software MEGA5 a partir de 27 proteínas deduzidas de Aox de plantas da Ordem Fabales mais os membros da família multigênica da Aox de *Arabidopsis thaliana* como grupo externo. Aox1 de *Medicago truncatula* e *Medicago sativa* posicionam em um mesmo ramo, o mesmo ocorre com Aox2a do gênero *Medicago*. Aox2b1 de *Medicago truncatula* foi agrupada juntamente com Aox2b2 de *Medicago sativa*. Esses agrupamentos mostraram que Aox1, Aox2a, Aox2b (2b1 e 2b2) do gênero *Medicago* são ortólogos a *Vigna unguiculata*.

4.2. Qualidade do RNA total extraído

Os RNA's totais extraídos foram de boa qualidade para realização das PCR semiquantitativas de acordo com os parâmetros estabelecidos por Sambrook et al (1989) e Udvardi et al (2008). As relações de dosagem dos RNA's extraídos variaram de 1,8 até 2,68 para $^{260}/_{230}$ e de 1,71 até 2,11 para $^{260}/_{280}$. A integridade dos RNA's não mostraram sinais de degradação quando visualizados em gel de agarose de 1,5% e corados em brometo de etídio.

Seqüência parcial Aox1 de *Medicago sativa*

ctggagaagatggcattatggactgttaagagtcttaggtatccaactgatttcoctttt
L E K M A Y W T V K S L R Y P T D F L F
cagagaaggtatggatgccgagcaatgatgcttgagacagtagctgctgcccctggcatg
Q R R Y G C R A M M L E T V A A V P G M
gtaggaggaatgctgcttcaactgcaaatcattgocgocgatttgagcacagtggtggatgg
V G G M L L H C K S L R R F E H S G G W
atcaaagctttgctagaagaagcagagaacgagcgcgatgcacctaagctttcatggaa
I K A L L E E A E N E R M H L M T F M E
gtggcaaaagcaagtggtatgagcgtgcaacttgataaactgtccagggtttttcttc
V A K P K W Y E R A L V I T V Q G F F F
aatgcttatttcttaggctatttgcctcaccocaaatttgacacccgatgggttggttac
N A Y F L G Y L L S P K F A H R M V G Y
ctcaggaagaagctattcaactcatacactgagtttctcaaggagcttgacaagggtaat
L E E E A I H S Y T E F L K E L D K G N
attgaaatgtccctgctccagctattgctattgactattggcagcttccocaaactct
I E N V P A P A I A I D Y W Q L P Q N S
actttaagggatgtgttagaggttgcaaatccc
T L R D V V E V V K S

Seqüência parcial Aox2a de *Medicago sativa*

tcattgtccgaagaattttatggataatgtcgttacaggacagtgaaagcttccagaatt
H V P K N F M D N V A Y R T V K L L R I
cccactgatgtgttttaagagacgttatggctgocggtgcaatgatgctcgaaacagtt
P T D V F F K R R Y G R R A M M L E T V
gcatctgtccgtggaatgggtggaggatgctgttgcaactcaagtcactccgaaaattt
A S V R G M V G G M L L H L K S L R K F
cagcatagtggtggtggtgcaagcattgcttgaagaagcagagaatgagaggatgcac
Q H S G G W V K A L L E E A E N E R M H
ctaactgatgttagaactgtgaagccgaaatggatgagagatttctggttcttctgct
L M T M V E L V K P K W Y E R F L V L A
gtacagggagttttctcaatgcattctttgtcctttacatacttccccaaagggtgct
V Q G V F F N A F F V L Y I L S P K V A
catagagttggtggtacacttgaagaagaagctatacattcactgagatttgaag
H R V V G Y L E E E A I H S Y T E Y L K
gacattgatgtggtgcaattgaaatgttctctgctcctgcaatgcaatagactattgg
D I D S G I E N V P A P A I A I D Y W
aggcttcccaaggatgccaattgaaagatgtcataacagtcattcgcgctggggaaaat
R L P K D A K L K D V I T V I R A G E N
caccatcgggatgtgaaccacttgccttcaga
H H R D V N H F A S

Seqüência parcial Aox2b2 de *Medicago sativa*

aaggaggatggaactgagtggtccatggaactgcttccatgcccattggaaagttacagttca
K E D G T E W P W N C F M P W E S Y S S
gatgtgcaatagatgtgaccaagcatcatgtgcccccaaaactttggggacaagttagct
D V S I D V T K H H V P K T F G D K L A
ttcagatctgtcaagtttctaaggggtgctctctgatttgtacttcaaggaacgataggt
F R S V K F L R V L S D L Y F K E R Y G
tgccacgcaatgatgctagaacaatagcagctgtccctggaatgggtgggaggatgctt
C H A M M L E T I A A V P G M V G G M L
ttacacttaaaatctctaagaaaatttcaacaocgocggtggttgatcaaagcattactt
L H L K S L R K F Q H A G G W I K A L L
gaagaagcagagaatgagaggatgcatgttgatgacaatgggttgaactgtgaaaccaagt
E E A E N E R M H L M T M V E L V K P S
tgccatgagaggcttttgggttattactgcaacaaggagttttcttcaatggattctttgtg
W H E R L L V I T A Q G V F F N G F F V
ttttacatcctctcaccgaaaatagcgcgatagatttgggttatttggaggaggaagct
F Y I L S P K I A H R F V G Y L E E E A
gtgatttcatacacacaacatttagatgcaattcaaagtggttaaagtgagaaatgtacct
V I S Y T Q H L D A I Q S G K V E N V P
gctcgtgattgcaatgattattggagaacttccaaaggatgcaactcttaagcca
A R D I A I D Y W R L P K D A T L K P

Figura 05 – Sequências parciais de nucleotídeos (letra minúscula) e aminoácidos deduzidos (letra maiúscula) de Aox de *Medicago sativa*.

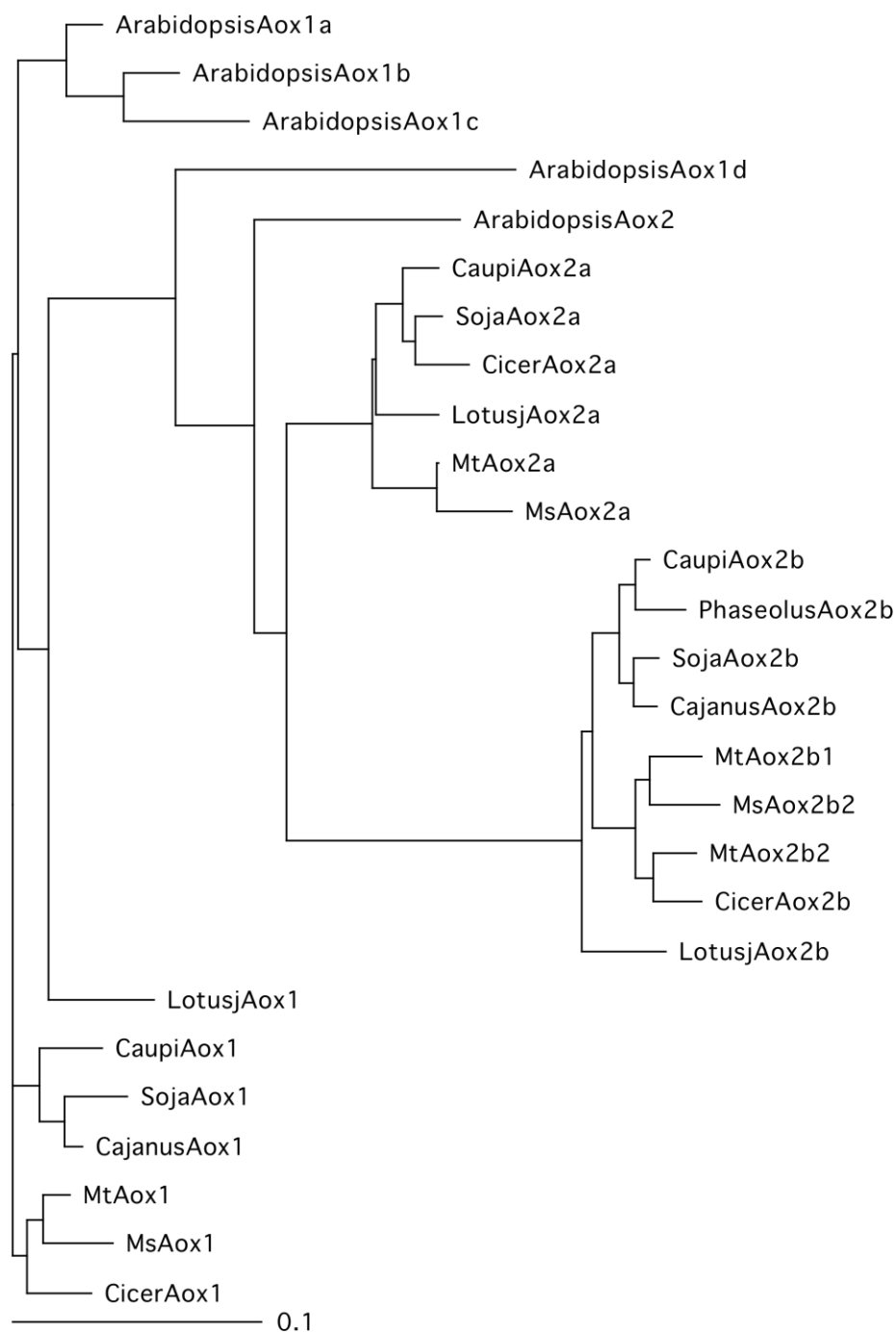


Figura 07 – Árvore filogenética da Aox gerada pelo software MEGA5 a partir de 27 sequencias de proteínas deduzidas de Aox [*Vigna unguiculata* (Aox1a, Aox2a, Aox2b), *Glycine max* (Aox1, Aox2a, Aox2b), *Lotus japonica* (Aox1, Aox2a, Aox2b), *Medicago truncatula* (Aox1, Aox2a, Aox2b1 e Aox2b2) *Medicago sativa* (Aox1, Aox2a e Aox2b2), *Phaseolus vulgaris* (Aox2b), *Cajanus cajan* (Aox1, Aox2b), *Cicer arietinum* (Aox1, Aox2a, Aox2b), *Arabidopsis thaliana* (Aox1a, Aox1b, Aox1c, Aox1d e Aox2)].

4.3. Expressão da Aox durante o início da germinação de *Medicago sativa*

O perfil transcricional dos genes Aox durante a germinação de sementes de *Medicago sativa* foi avaliada por RT-PCR nas condições 0 (sementes secas), 24 e 48 horas de desenvolvimento em papel de filtro umedecido (Figura 07-R). Todas as reações foram padronizadas com 24 ciclos. Além disso, gene da Actina foi usado como gene de referência.

Todos genes Aox foram detectados durante a germinação, menos ambos Aox2b (2b1 e 2b2) em sementes secas (0 hora). Aox2b2 mostrou ter a menor quantidade de transcritos nesse tipo de tecido e nos tempos analisados além de ser fracamente induzido durante o desenvolvimento. Durante os tempos estudados, Aox2a mostrou-se um perfil de expressão constitutivo. Por outro lado, Aox1, Aox2b1 e Aox2b2 tem sua expressão aumentada durante o desenvolvimento. Aox1, Aox2b1 e Aox2b possuem um pico de expressão 24 horas após o início da germinação. Contudo, no tempo de 48 horas pós germinação Aox1 mantém-se os níveis de transcritos elevados enquanto ambos Aox2b tem seus níveis de transcritos diminuídos (Figura 07-R).

4.4. Efeitos dos estresses na expressão dos genes da Aox em folhas e raízes de *Medicago sativa*

A análise da expressão gênica por RT-PCR foi realizada usando o gene da Actina como normalizador. Todas as reações de RT-PCR (em raízes e folhas) foram padronizadas em 26 ciclos para que os resultados de expressão pudessem ser comparados.

A análise dos transcritos em folhas mostrou uma co-expressão dos genes Aox de *Medicago sativa* sob o efeito dos estresses (Figura 8A-R). Em folhas, MsAox2a apresentou um expressão constitutiva similar aquela apresentada pelo gene da Actina. Contudo, os demais genes da Aox em *Medicago sativa* (MsAox1, MsAox2b1 e MsAox2b2) mostraram alterações em seus transcritos quando expostos aos tratamentos por: Ácido Salicílico, PEG, H₂O₂ e Cisteína, em relação a abundância e a cinética da expressão dos transcritos. Em todos os tratamentos analisados, os níveis mais baixos de transcritos detectados foram para MsAox2b2 que, praticamente, foi fortemente estimulado somente por Ácido Salicílico e não foi detectada presença de transcritos na condição controle. Nas condições de estresses estudadas, MsAox1 e MsAox2b1 tem um perfil de expressão gênica bastante similar onde a partir de 6 horas após aplicação de Ácidos Salicílico tem uma alta indução da expressão gênica mantendo-se praticamente constante até 24 horas. Quando exposta a PEG e H₂O₂,

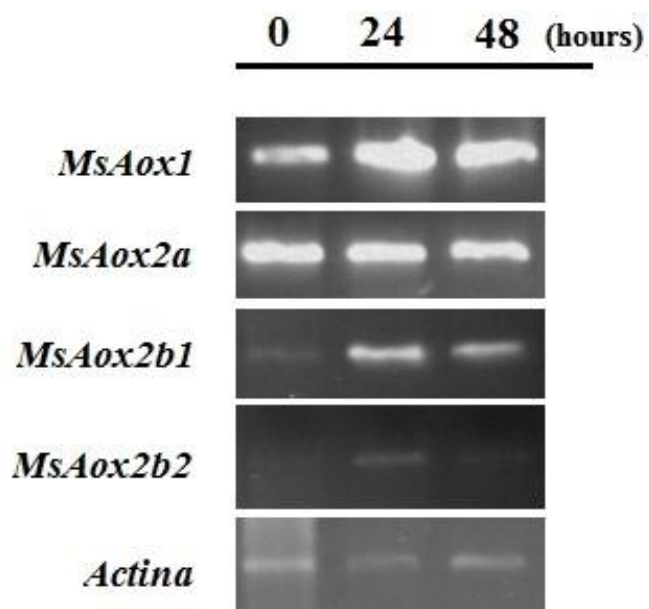


Figura 08 – Níveis de transcritos dos genes Aox em sementes de *Medicago sativa* durante as primeiras horas de germinação. O gene da Actina foi utilizado como gene de referência. Os produtos de RT-PCR foram detectados em gel de agarose 1,2% usando o corante brometo de etídio (0,5µg/mL).

MsAox1 e MsAox2b1 tem uma diferença temporal na expressão gênica na qual MsAox1 é induzida mais rapidamente do que MsAox2b1, pois em PEG MsAox1 responde após 12 horas da aplicação do estresse chegando a um pico máximo 24 horas depois, enquanto MsAox2b1 é induzido somente após 24 na presença do estresse. Por sua vez, MsAox1 aumenta um pouco sua expressão na presença de H₂O₂ logo após 6 horas na presença do estresse voltando ao nível basal, em contra partida MsAox2b1 tem uma indução similar apresentada na presença de PEG. Na presença de cisteína, a resposta de MsAox1 e MsAox2b1 é tardia, apenas 24 horas após aplicação do estresse. Com exceção do tratamento por ácido salicílico, MsAox2b2 não teve forte alteração na quantidade de transcritos quando comparado os genes Aox1 e Aox2b1 na presença de PEG, H₂O₂ e Cisteína.

Em raízes foi observado um resultado semelhante ao encontrado nas folhas (Figura 8B-R). Da mesma forma, o gene MsAox2a mostrou-se ser um gene constitutivo, mas bem menos expresso do que em folhas. Nem todos os estresses resultaram em mudanças nos transcritos dos demais genes de MsAox. Neste ponto, PEG alterou apenas o gene MsAox1 no qual teve dois picos de expressão de transcritos, sendo o primeiro 6 horas após aplicação do PEG e o segundo somente 24 horas depois. Contudo, os demais estresses (Ácido salicílico, H₂O₂ e Cisteína) tiveram efeitos nos genes MsAox1, MsAox2b1 e MsAox2b2. Quando comparado a folha, Aox2b2 teve indução na condição controle em intensidade semelhante as dos genes Aox1 e Aox2b1. Ácido salicílico teve um efeito bastante rápido na expressão dos transcritos, pois 24 após a exposição não foi mais detectado produtos de RT-PCR para MsAox1, MsAox2b1 e MsAox2b2. Porém, sob efeito de ácido salicílico, MsAox1 teve um ligeiro aumento na expressão em 6 horas decaindo até 12 horas e não sendo mais detectado em 24 horas. MsAox2b2 teve um comportamento similar a MsAox1, mas com os mais baixo níveis de transcritos observados. Já MsAox2b1 mostrou-se mais duradouro a expressão gênica, pois teve forte detecção de produtos de RT-PCR para MsAox2b1 em 6 horas de após a presença do estresse mantendo-se até 12 horas e não sendo detectado em 24 horas. H₂O₂ e Cisteína foram as condições que mais afetaram a magnitude da expressão gênica. O primeiro, H₂O₂, apresentou grande quantidades de transcritos de MsAox1 e MsAox2b1 nas primeiras 6 horas pós-estresse mantendo-se elevada até 24 horas. MsAox2b2 na presença de H₂O₂ (bem como cisteína) teve um aumento na expressão gênica em 6 horas decaindo até 24 horas pós aplicação do estresse.

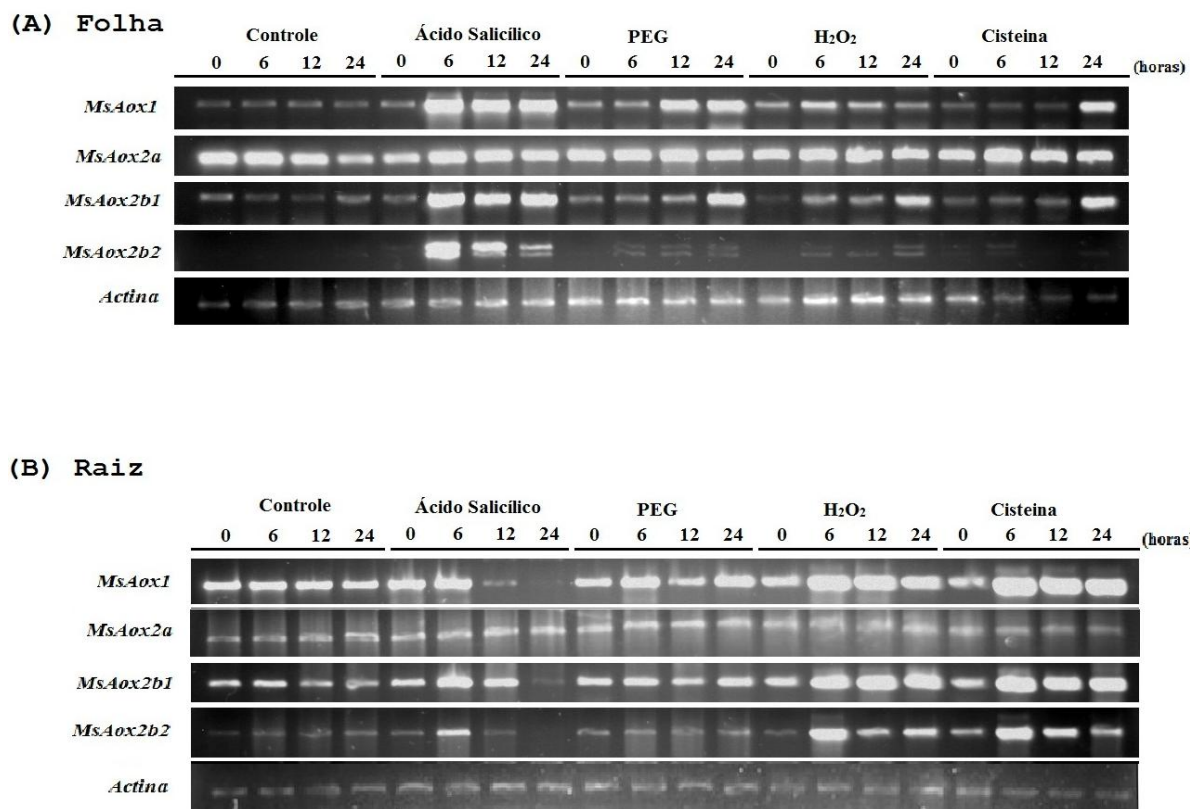


Figura 09 - Níveis de transcritos dos genes Aox de *Medicago sativa*, (A) folha e (B) raiz, submetidas aos seguintes condições de estresse: ácido salicílico (xx), PEG 100,37g/L, H₂O₂ 10mM e Cisteína 0,5mM analisados por RT-PCR semi quantitativa. O gene da Actina foi utilizado como gene de referência. Os produtos de RT-PCR foram detectados em gel de agarose 1,2% usando o corante brometo de etídio (0,5µg/mL).

4.5. Qualidade do DNA extraído e clonagem dos promotores

O DNA genômico extraído foi de boa qualidade de acordo com os parâmetros estabelecidos por Sambrook et al (1989) e Udvardi et al (2008). As relações de dosagem do DNA extraído foram: $^{260}/_{230}$ igual a 2,15 e $^{260}/_{280}$ igual a 2,07. A integridade do DNA não apresentou degradação sendo, então, de boa qualidade para realização das reações de PCR (Figura 9A). Todos os produtos de PCR apresentaram temperaturas ótimas de anelamento dos primers muito próximas a 57 oC.

4.6. Clonagem e análise dos promotores da Oxidase Alternativa de *M. sativa*

O resultado do seqüenciamento dos promotores resultou em três diferentes seqüências correspondendo aos promotores dos genes MsAox1, MsAox2b1 e MsAox2b2. A partir deste momento, os promotores dos genes citados anteriormente serão denominados pAox1, pAox2b1 e pAox2b2 para evitar uma confusão com as seqüências obtidas de cDNAs da Aox. Contudo, o seqüenciamento de pAox2b2 não funcionou após a análise da seqüência bruta. Logo, não foi analisado. A seqüência consenso para pAox1 resultou em uma seqüência de 1177pb (Figura 10). Contudo, o local de inicial da transcrição (TSS, sigla em inglês) ocorre a partir do nucleotídeo da posição 550 e a partir da posição 655 é codificado a primeira metionina, ou seja, somente a região upstream a TSS, correspondendo a um fragmento de 549pb, representa o promotor pAox1 de *Medicago sativa*. Para pAox2b1 resultou um fragmento consenso de 1167pb (Figura 11). TSS está localizado na posição 832 e a partir da posição 955 é sintetizada a primeira metionina, ou seja, uma região upstream a TSS, correspondendo a um fragmento de 831pb, representa o promotor pAox2b1.

4.7. Análise e identificação in silico de elementos regulatórios dos promotores da Aox de *Medicago sativa*

Uma comparação entre os promotores Aox1 e Aox2b1 de *Medicago sativa* não mostraram um seqüência conservada entre eles quando realizado um alinhamento local pela ferramenta Blast.

Como mencionado, um fragmento de 549pb e 831pb foram determinados sendo as regiões promotoras dos genes Aox1 e Aox2b1 de *Medicago sativa*, respectivamente. Individualmente, esses fragmentos de DNA foram analisados pelos softwares PLACE e PlantCare sendo encontrados motivos regulatórios nesses promotores (Figuras 13 e 14).

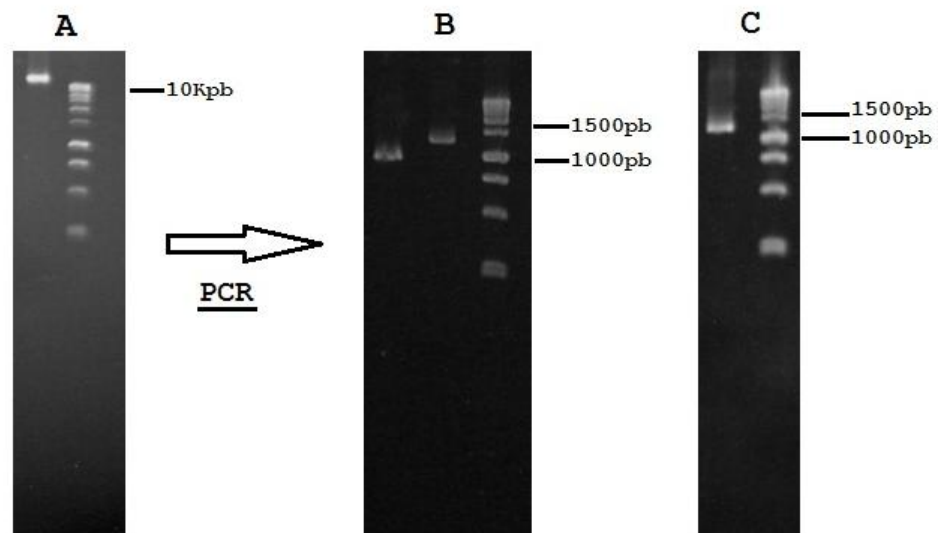


Figura 10 – A) Eletroforese em gel de agarose 1,0%, coluna 1 DNA genômico extraído de folhas de *Medicago sativa* pelo método CTAB, coluna 2 marcador DNAlabber 1Kb (Promega, USA). (B) Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando os produtos de PCR amplificados e purificados dos promotores dos genes *MsAox1* (coluna 1), *MsAox2b2* (coluna 2) e marcaodr DNA labber 1Kb (coluna 3). (C) Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando os produtos de PCR amplificados e purificados dos promotores dos genes *MsAox2b2* (coluna 1) e marcador DNA labber 1Kb (coluna 2).

Seqüência do promotor do gene *Aox1* de *Medicago sativa*

AATCCTCTAGTTGTCCGATATTTAATTGAAATTAATTAATTAATTTTATATGCCTTTTCAAAATAATTTTTTT
 TGTCAAGCAGCATTTCAATTTTTTTTTGTCAAGCAGCAAGTGGTCAGATGAGTATAATTGGGTTTGTCCGAAAT
 TCGAACCTCAATCTCAGCCTATAAATATTTTACATGATATATATTACTTTTCTTTAGGGAACATGATATATAA
 ATCACTAATTTTTTTTTTTAAGAACTAAATTAGTTCATCCAAACAGACACCAGGAAAAATTGAATCTAAAC
 TTTGAGGAGGAGCACACTTTCAAGGTCCCAATAAGTGGGTAAATTACTAATTTTTTATTTTTATATGCAGA
 TATATTACTAATTGAGGGTAATAATTCTATAAAAAAATTAAAAAAAGAAAATACGAATGGGTATAATTGAAC
 ATTGACAGCGTAAGATGCCAACTAATACACGCAAATAATAACGCAAATAGAATCATAAACCGTAAATATAAA
 TAGACCCTTCTTAAACCCTTTCTTTCTCCACAAGACAAAACATAAACATAAACCTAAAACCTTTCTCTCTCT
 TTCTCTAATATTCTTTTCAAAATTCTTTCTCTTTCTTTCTTTGCCGTTTTTCGTCTGTTCCGGAACGAAGAAGAT
 GATGATGATGAGGCATGGTGGTCACGGTGTCTGCTATGAACACCGTAATGTTGTTTGCAAAGAAGGGTTTATTA
 GGTGATGAAGTTGGTGTTCCAAACAAATGGGGTTATTTTGTAGATCAACAACCCCTCTTGTAAAGGAACGCAA
 GCACCTTCACTGCTAATCTGTCTGATCAGATCAGAAGGACGACAAGACTGTCGACAAAACCCGTCGTCTGTCGTC
 TCAGGGTGGTGTGGTGATAACAAAGATGAAAAAGGGATTACGAGTTATTGGGGTGTTC AACCTTCTAAGATC
 ACAAACCTGATGGTACTGAATGGAATGGAATTGCTTCAGGGTATGTTATTGCTATGTTACATCTTTTGATC
 TTGTTTTTTGAGAAAAATGATTTTTTTTTTAATGTGGATTTTGATTGCGACAGCCATGGGAGACATACAAAGCA
 GATGTTACGATTGATCTGACTAAACATCATAAACCAACAACCTTTCTGGACAAGATGGCTTATTGGAATCCCG
 CGGCCATGG

atgatgatgatgagggcatgggtgggtcacgggtgctgctatgaacaccgtaatggtggttgca
 M M M M R H G G H G A A M N T V M L F A
 aagaagggtttattaggtgatgaagttgggtgttccaaacaaatggggttattttgtaga
 K K G L L G D E V G V P N K W G Y F V R
 tcaacaacccctcttgtaaggaacgcaagcactttcactgctaactctgtcagatcagaag
 S T T P L V R N A S T F T A N L S D Q K
 gacgacaagactgtcgcacaaaactccgctcgtcgtcgtcctcaggggtgggtgctggat
 D D K T V D K T P S S S S S Q G G A G D
 aacaagatgaaaaagggattacgagttattgggggtgttcaaccttctaagatcaca
 N K D E K G I T S Y W G V Q P S K I T K
 cctgatggtaactgaatggaaatggaattgcttcagg
 P D G T E W K W N C F R

Figura 11 - Fragmento gênico sequenciado a partir do DNA de *Medicago sativa*. Região do promotor do gene *Aox1* de *Medicago sativa* usando primers específicos de acordo com a tabela 1. Em cinza, região 5'UTR e em amarelo região codante do gene *Aox1*. Abaixo da sequência nucleotídica sequência de aminoácidos da região codante em amarelo. Em verde região do vetor de ligação pGEMT-easy.

B Sequência do promotor do gene *Aox2b1* de *Medicago sativa*

```
GATTCAGATTAAGCTCTAACCCTATGTAATAACCAATTGAGGTTTATTATAGAGAATAGGAAT
TGCTGTATGACTAATTCAACCAAATAATTTATATTCTCACTGATTCCTAAATTTGTGTAAATC
AACCTATGGTTAGGTCCAAACTTCAAGCGATTGCAATATCTTTGCCAAAACGAATTATCCACC
AGGGTTAGTAAGTATGTTCAACAGCGTTTTAGAAATATATACAAGAAACAAATATCTATAATGA
ACATAATATCAAAGTAGATAAACACAAAAAACAATAACATGTACAAATTCACATAAAGA
AACATTACAAAAACATATTTGAACAAAAAGAAAAATACTGCAATAATGTAACAAAAAAGT
ACTGCAATAACAAGAACTGTTGTTTCAACTTGATTGTAAATTGTAATTGTAATTTCTTGAAC
TGTCTTTGATGAATTTCTCTAAAGTCAAAGAAAGAACAGCATTAGACTATTCCCAAGAT
TCTAGTTCCTTCTTCTTGGGGATATTGCATTGCATTTGCATCACGTAAAGAAAGTAACCATTG
AATTGAAATGAACTAGTAGTAATAATCTAGTCAAGAAGAAAATAGTTATAATAATAATCAAAGG
AGGTGAAAAGTCCACAAAAGCCTAAGTGGCAGCGCTGACTGAACATATTC AATTC AACTTTGT
GGCAACTAATCAACCACTGATGCAAAATTCAATAATTTAACAAACATAATTAACATCTAAAGC
AACAAAACCACATGAAACCTTCCTCGACCTTCTTCTTGGAGTTACCTTGTCTTGTGGCAAAT
ACAAAGTTGAATACGAAAAC TATATGTTAAAT TATTAATACACACTCCTAAATTCATTGTATGT
ATAAATATAGGTCTTCAATTC TTTTT CATCCAAAAGTTATAAAACATTTACATTCAACATGAG
AAACATTTTACTAAGGTCAACTACACGAGCTTTGTTCCGCAGTGGTGGGA ACTACCACCGCAGT
TTTCAACAGTGGTGATAGTT CAGCCGAGACAACATCAGCATGGCAGTGGTGC GTGTGGTAACT
TGTACTGGCAGAGAATCAC TAGTGCGCGGAGCCTGCAGGTGACCATATGGGAGAGCTCCCCAC
CCGCTTGGTCAATGCA
```

```
atgagaacattttactaaggtcaactacacgagctttgttccgcagtggtgggaactac
M R N I L L R S T T R A L F R S G G N Y
caccgcagttttcaacagtggtgatagttcagccgagacaacatcagcatggcagtggt
H R S F S T V V I V Q P R Q H Q H G S G
gcgtgtggtaacttgtactggcaga
A C G N L Y W Q
```

Figura 12 – Fragmento gênico sequenciado a partir do DNA de *Medicago sativa*. Região do promotor do gene *Aox2b1* de *Medicago sativa* usando primers específicos de acordo com a tabela 1. Em cinza, região 5'UTR e em amarelo região codante do gene *Aox2b1*. Abaixo da sequência nucleotídica sequência de aminoácidos da região codante em amarelo. Em verde região do vetor de ligação pGEMT-easy.

Interessante foi que não foi encontrado a região de TATA-box na posição -30 do promotor em ambos promotores. Ao invés disso, uma variação CTTCTT na posição -26 a partir da TSS foi encontrada. Desses elementos regulatórios encontrados são relacionados em vários processos celulares, como em: pAox1 relacionados com hormônio [GARE (Ácido Abcísico); Pyrimidine Box (Ácido Giberélico)], biótico estresse (W-Box), abiótico estresse [HSE (calor); LHE (frio)], tecido dependente [SEF1, SEF3 e SEF4 (tecidos jovens), Root motivo e bZIP (embrião e resposta a Ácido Giberélico)], induzidos por luz (T-Box, GT1 box, TCT motivo e AT1 motivo) e CCAAT Box (regulação dos genes dos complexos regulatórios) e pAox2b1 relacionados com hormônios [ABRE (Ácido Abcísico); GARE (Ácido Giberélico)], biótico estresse (TC rich repeat, W-Box; L-Box), abiótico estresse (MYB; MYC) e tecido dependente [Root motivo (raiz); Skn1 motivo (endosperma); SEF4 (tecido jovens)], induzidos por luz (GATA motivo, AE Box, G Box, Ga motivo) e CCAAT Box (regulação dos genes dos complexos regulatórios). Todos os motivos reconhecidos pelos softwares PLACE e PlantCare estão nas tabelas 03 e 04.

Tabela 03. Elementos regulatórios cis encontrados no promotor do gene de Aox1 de *Medicago sativa* e suas respectivas funções de posições na fita.

Nome Motivo	Função	Fita
AT1 motivo	Resposta a luz	(+)
GT1 Motivo	Resposta a luz	(+)
TCT motivo	Resposta a luz	(-)
T-Box	Resposta a luz luz	(+)
GARE	Resposta a ácido giberélico	(+)
Pyrimidina box	Resposta a ácido giberélico	(+)
bZIP	Resposta por ácido abcísico e tecido específico	(+)
Root motivo	Induzido em tecido radicular	(-)
SEF1 MOTIF	relacionado com tecidos jovens	(+)
SEF3 MOTIF	relacionado com tecidos jovens	(-)
SEF4	relacionado com tecidos jovens	(+)
LTR	Induzido por baixa temperatura	(+)
HSE	Induzido por calor	(+)
W-box	Defesa a ataque de patógenos	(+)
CCAAT box	Regulação dos genes dos complexos respiratórios	(-)

Tabela 04. Elementos regulatórios cis encontrados no promotor do gene de Aox2b1 de *Medicago sativa* e suas respectivas funções de posições na fita.

Nome Motivo	Função	Fita
GATA motivo	Resposta a luz	(-)
AE box	Resposta a luz	(+)
G box	Resposta a luz	(-)
Ga motivo	Resposta a luz luz	(-)
ABRE	Resposta a ácido abscísico	(+)
GARE	Resposta a ácido giberélico	
AMY box	Iduzido por ácido giberélico/ degradação de amido	(+)
SKn1 motivo	Indução tecido/específico: endosperma	(-)
Root motivo	Indução tecido/específico: raiz	(+)
SEF4 MOTIF	Relacionado com tecidos jovens	(-)
TC-rich repeat	Defesa a ataque de patógenos ou estresse abiótico	(+)
MYB	Resposta a desidratação	(+)
MYC	Resposta a desidratação	
L Box core	Defesa a ataque de patógenos	(+)
W-box	Defesa a ataque de patógenos	
CCAAT	Regulação dos genes dos complexos respiratórios	(+)
Dof core	Encontrado somente em promotores de plantas	(-)

5. DISCUSSÃO

5.1. Família multigênica da Aox do gênero *Medicago*

Nesse trabalho foram caracterizamos os genes da Aox do gênero *Medicago* (*Medicago truncatula* e *Medicago sativa*). Os resultados iniciais da anotação dos genes Aox de *Medicago truncatula* a partir do genoma disponível no servidor phytozome relatam que isoformas Aox tipo 1 compartilham o posicionamento no mesmo cromossomo com Aox tipo 2 (tabela 2). Essa informação é valiosa, pois, em geral, genes próximos no mesmo cromossomo podem ter um padrão de expressão semelhante (HERSHBERG et al., 2005). Esse fator posição no cromossomo em relação a expressão é observado em *A. thaliana* onde Aox1a [cromossomo 3 (localização ATG3G22370)] é co-expresso com outros genes no mesmo cromossomo (localização: ATG3G50930, AT3G28580 e AT3G30775) (CLIFTON et al., 2006). Um estudo detalhado entre Aox de *Arabidopsis thaliana* mostra que os genes AtAox1a e AtAox1c (no mesmo cromossomo) são co-expressos por estresses (CLIFTON et al., 2005). Contudo, outra espécie que tem sido bastante estudada a expressão da Aox é soja no qual somente Aox1 é induzido na presença de estresse (WHELAN et al., 1996, FINNEGAN et al., 2004). Nesse caso, sabe-se que Aox1 e Aox2 (Aox2a e Aox2b) estão em cromossomos diferentes (tabela 2). Juntando-se a isso, foi relatado até o momento que em *Vigna unguiculata* existe uma co-expressão, induzido por estresses, entre as duas subfamílias (VuAox1 e VuAox2b) (COSTA et al., 2010). Então é visto que a presença de genes das duas subfamílias no mesmo cromossomo seja fundamental para que exista uma expressão similar entre os genes Aox. Contudo, essa idéia, de que a localização dos genes das duas subfamílias no mesmo cromossomo tende a forçar uma co-expressão, poderá ser fortalecida pela determinação da localização dos genes Aox1/Aox2b através do seqüenciamento do genoma de *Vigna unguiculata* (COSTA et al., 2010).

Em *Medicago truncatula*, a família multigênica é composta de 4 membros: apenas 1 tipo Aox1 e três isoformas tipo Aox2 (Figuras 04), bem como, a presença de no mínimo três genes Aox em *Medicago sativa* (1 isoforma Aox1, e duas isoformas Aox2) (Figura 05). Esse padrão de duplicação está de acordo com o apresentado pela família Fabaceae, como em caupí e soja (COSTA et al., 2004; WHELAN et al., 1996). A análise filogenética mostra as distinções entre as duas subfamílias de Aox na Ordem Fabales (Figura 07). Quanto ao agrupamento entre Aox2b1 de *Medicago truncatula* e Aox2b2 de *Medicago sativa* em um único ramo pode ser pelo fato que em *Medicago sativa* somente um fragmento interno bastante conservado entre AOX de plantas foi clonado e seqüenciado. Para a resolução do

problemas deve-se realizar o seqüenciamento completo dos genes Aox2b2 e gene Aox2b1 (pendente) *Medicago sativa*.

5.2. Expressão gênica da Oxidase Alternativa de *Medicago sativa*

Os resultados encontrados durante a germinação de sementes de *Medicago sativa* mostraram a participação de todos os genes Aox nas primeiras horas de desenvolvimento. Em sementes secas (0 horas) havia o acúmulo de transcritos de Aox1 e Aox2a. Somente após a quebra da dormência ambos os genes Aox2b (2b1 e 2b2) tiveram detecção e aumento, juntamente com Aox1, de transcritos (Figura 02-R). A co-expressão encontrada entre Aox1, Aox2b1 e Aox2b2 em *Medicago sativa* assemelha-se bastante aquela vista em *Vigna unguiculata* onde VuAox1 e VuAox2b durante a germinação são, também, co-expressos (COSTA et al., 2010). Após a hidratação da semente e quebra da dormência, a germinação é um processo no qual resulta um grande consumo de oxigênio pela mitocôndrias seguido proporcionalmente por um aumento na concentração de EROs celular (JOB et al., 2005; NAYDENOV et al., 2008). Além disso, é sugerido que durante o início da germinação que o consumo de oxigênio pela mitocôndrias se dá relacionado com respiração clássica mediada pela citocromo oxidase (ATTUCCI et al., 1991). Contudo, em sementes de milho durante a germinação só há um aumento na respiração alternativa causado pelo acúmulo dos transcritos de WtAox1a nas primeiras horas de desenvolvimento da semente depois que a via clássica da respiração é inibida (NAYDENOV et al., 2008). Estes resultados da participação e aumento dos transcritos de Aox1 em milho somente após a inibição da via clássica vão no sentido contrario aqueles encontrados em Aox de *Medicago sativa* mostrados nesse estudo e os dados publicados com *Vigna unguiculata* (COSTA et al., 2010). A participação das isoformas duplicadas de Aox2b de *Medicago sativa* tem uma expressão semelhante a encontrada em *Vigna unguiculata* onde VuAox2b é detectada 24 horas após o início da germinação. Além disso, EST de Aox2b1 de *Medicago truncatula* (DW018772) foi encontrada a partir da elaboração de biblioteca de cDNA oriunda de sementes no início de germinação. Quanto a isoforma Aox2a em *Medicago sativa*, esta mostrou-se presente intensamente em todas as horas estudadas e sem apresentar alterações na quantidade de transcritos. Tais resultados são semelhantes aos encontrados em *Vigna unguiculata* (COSTA et al., 2010). Neste estudo de Costa e colaboradores, observou-se pela primeira vez altos níveis de transcritos de Aox tipo-2 (VuAox2a) em tecido não fotossintetizante indo ao contrario do proposto por Considine e colaboradores (2002). Em *Medicago sativa*, Aox2a também teve uma grande acumulação em sementes (tecido não fotossintetizante) mantendo-se constante até 48 horas após o início da

germinação. Em paralelo, um estudo detalhado do ciclo de vida de *A. thaliana* indica que transcritos de *AtAox2* são detectados e armazenados em maior quantidade em sementes maduras (NAKABAYASHI et al., 2005). Como atualmente sugere-se que *Aox2a* de *Vigna unguiculata* tenha um papel semelhante aquele encontrado em *Aox2* de *Arabidopsis thaliana* e que nos resultados mostrados nesse trabalho indicam que *Aox2a* de *Medicago sativa* apresenta um perfil de expressão semelhante aquele apresentado por em *AtAox2* e *VuAox2a* tais achados estão de acordo com os dados presentes na literatura, apesar destes necessitarem de mais investigações para determinar o verdadeiro papel dos genes *Aox* tipo-2 constitutivos na germinação (CLIFTON et al., 2006).

Em plantas jovens de *Medicago sativa* submetidas a condições de estresses foi observada a expressão dos genes *Aox* em todas as condições de tratamento tanto em folha quanto em raiz. O estresse por ácido salicílico promoveu, em folhas, a maior indução dos transcritos de *Aox*. Resultados similares de indução de expressão gênica a esse estresse foram encontrados em outros trabalhos usando *Glycine max* (indução dos genes *GmAox1* e *GmAox2b*), *Citrus sinensis* (indução do gene *CsAox1a*), *Lycopersicon esculentum* (indução dos genes *LeAox1a* e *LeAox2*) e *Vigna unguiculata* (indução do gene *VuAox2b*) (FUNG et al., 2006; MATOS et al., 2009, DAURELIO et al., 2009; COSTA et al., 2010). Sabe-se que ácido salicílico é um mediador de estresse biótico levando a uma resposta de defesa vegetal ao hospedeiro. Hanqing e colaboradores (2010) sugerem que *Aox* media uma resposta entre a respiração e vias de defesa pela integração dos ácidos orgânicos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, principalmente, na via do chiquimato. Além disso é proposto que *Aox* funcione como uma proteína repórter a estresse biótico (VAN AKEN et al., 2009; MATOS et al., 2009).

O tratamento por PEG apresentou uma modulação dependente do tecido, pois em raízes somente o gene *MsAox1* é induzido. Esse achado é contrário aquele encontrado em raízes de *Vigna unguiculata* na presença de PEG onde somente *VuAox2b* teve expressão detectada (COSTA et al., 2007). Em folhas, a indução dos genes *MsAox1* e *MsAox2b1* é parecido com aquela encontrada em *Vigna unguiculata* (COSTA et al., 2010). Estresse causado pela desidratação induzida por PEG leva a uma mudança no metabolismo celular no qual pode alterar as taxas respiratórias de diferentes formas, como diminuição da fonte de carbono e, conseqüentemente, queda de ATP (ATKIN et al., 2009). Em raiz, por se tratar de um tecido não fotossintetizante, a quase totalidade de síntese de ATP vem da fosforilação oxidativa resultante da cadeia transportadora de elétrons mediado pela via clássica. Ao contrário, em folhas, o cloroplasto é o principal responsável pela formação de moléculas de

ATP durante o dia deixando a função mitocondrial para reciclagem e manutenção do ciclo do ácido cítrico pela atividade da Aox (MOORE et al., 2001). Logo, a expressão aumentada da Aox em folhas pode estar relacionada a com a manutenção da reciclagem do ciclo do ácido tricarbóxico resultando na liberação de CO₂ que poderá ser usado nas etapas de assimilação do carbono na fotossíntese, uma vez que no estresse hídrico uma das consequências é o fechamento dos estômatos e diminuição da fotossíntese devido a escassez de CO₂ (BARTOLI et al., 2005, RIZHSKY et al., 2004). Este fato pode explicar as diferenças de intensidade da expressão da Aox em folhas e raízes quando submetidas a estresse hídrico. O aumento da expressão dos genes Aox1, 2b1 e 2b2 em folha e raiz de *Medicago sativa* causado por peróxido de hidrogênio é corroborado por vários estudos, pois o aumento da expressão da Aox causado por H₂O₂ é bem documentado em plantas (DJAJANERA et al., 2002; GRAY et al., 2004; CLIFTON et al., 2005; POLIDOROS et al., 2005; DOJCINOVIC et al., 2005). Por esses relatos na literatura, é sugerido para a AOX a função na prevenção de radicais livres proposto por Maxwell e colaboradores (1999). Cisteína promoveu uma forte expressão dos genes Aox em folha e raiz. Esses resultados são parecidos com os mostrados em cultura de células de *Arabidopsis thaliana* apresentados por Clifton e colaboradores (2005).

Nesse trabalho são apresentados resultados indicando uma co-expressão entre os genes Aox1 e os genes duplicados (parálogos) de Aox2b, principalmente com Aox2b1 de *Medicago sativa*. Aox2b respondendo a estresse ainda não é bem relatada, mas, a partir dos meados da década passada até o momento, esse paradigma, sugerido por Considine e colaboradores (2002) de que Aox tipo 2 possui expressão constitutiva, tem sido quebrado a partir de trabalhos com plantas de *Vigna unguiculata*, *Arabidopsis thaliana* e *Glycine max* (CLIFTON et al., 2005; COSTA et al., 2007; MATOS et al., 2009; COSTA et al., 2010). Assim sendo, esse trabalho com *Medicago sativa* torna-se importante por corroborar as novas idéias de que Aox2b é induzido, e co-expresso, a partir de sinais causados por condições estressantes.

Quanto as diferenças de expressão entre os genes Aox2b duplicados (Aox2b1 e 2b2), a maior diferença encontrada foi a expressão diferenciada de Aox2b2 entre tecidos. Em folhas, Aox2b2 não foi detectada na condição controle, sendo exclusivamente induzido por estresse. Por outro lado, Aox2b2 é detectada em raízes não submetidas a estresses.

5.3. Regulação da transcrição dos genes Aox

Buscando uma explicação para resposta e a co-expressão desses genes Aox estudados, este trabalho voltou-se para o entendimento dos promotores dos genes Aox1 e Aox2b1 de *Medicago sativa*. Quando comparados entre si nenhuma região de alta similaridade foi

encontrada nos promotores Aox1/Aox2b1 de *Medicago sativa*, mas nestes promotores foram encontrados vários motivos relacionados com a expressão tecido específico ou em resposta na sinalização a situações de estresse causados por ácido salicílico e estresses abióticos como: hídrico (PEG), oxidativo (H_2O_2) e por cisteína e que são compartilhado entre os genes Aox (Aox1 e Aox2b1) pela análise *in silico* realizado com os softwares PlantCare e PLACE (Tabelas 03 e 04).

Os resultados da germinação das sementes durante as 48 horas iniciais mostraram uma forte indução dos níveis de transcritos de Aox, principalmente Aox1, sendo este co-expresso com Aox2b1 e Aox2b2 (fraca indução). O processo de embebição de água e quebra da dormência das sementes resulta no início da germinação. Nesse começo há a participação de hormônios vegetais, como o ácido giberélico (TAIZ e ZEIGER, 2009). Nos promotores (pAox1 e pAox2b1) analisados dos genes Aox encontrou-se elementos regulatórios como: pirimidina Box e GARE que são responsivos a presença de ácido giberélico. Em cereais, o mecanismo de ação das giberelinas é bem estabelecida e está associada com a degradação da camada de aleurona para a liberação de enzimas hidrolíticas no endosperma, como α e β amilases que agem quebrando o amido de reserva que serve para produção de energia (TAIZ e ZEIGER, 2009). A caracterização da família multigênica e seus promotores de α amilases em arroz mostra a presença da sequência consenso TAACA(A/G)A, chamada AMY Box, em todos os membros da família multigênica da α amilase em arroz (HUANG et al., 1990). Esse mesmo elemento regulatório (AMY Box) é encontrado no promotor de Aox2b1 de *Medicago sativa*. Huang e colaboradores (1990), também viram a participação fundamental do domínio pyrimidine Box na expressão dos genes α amilase de arroz, por sua vez o domínio pyrimidine Box é encontrado também no gene Aox1 de *Medicago sativa*. É de se esperar que durante o processo de germinação e manutenção do crescimento o embrião necessite de grande quantidade de energia oriunda da oxidação de açúcares e ácidos orgânicos. Essa energia deve ser gerada pela via clássica da respiração mediada pela enzima citocromo c oxidase (Complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial) (ATTUCCI et al., 1991). Contudo, durante a germinação da semente há uma explosão da concentração de EROs que são deletérios as macromoléculas (APEL e HIRT et al., 2004; JOB et al., 2005). Então, é sugerido que durante a germinação a oxidase alternativa tenha o papel de promover a continuação do ciclo do ácido tricarbóxico para fornecer ácidos orgânicos intermediários que são substratos de outras vias biossintéticas além de manter a produção de energia na forma de ATP através do funcionamento do Complexo I da cadeia transportadora mitocondrial. Outras regiões

regulatórias foram encontradas como SKn1 motivo tem indução tecido-específico. SKn1 motivo possui expressão associada ao endosperma (WASHIDA et al., 1999). Em planta de tabaco mutante pela deleção dessa região do promotor do gene da proteína de reserva glutaina inviabilizou a germinação da semente. Recentemente, uma análise dos promotores de outros 54 genes chamadas SSP (seed storage protein) de três famílias botânicas (Brassicaceae, Fabaceae e Poaceae) mostram a presença e necessidade desse motivo para o germinação saudavel da semente (FAUTEUX et al., 2009).

Quanto a regulação da expressão dos genes Aox durante a submissão a estresses foram identificados outros elementos regulatórios importantes. Na presença de ácido salicílico (um mediador de estresse biótico), ainda não está claro o papel da indução dos genes Aox na interação planta-patógeno (DAURÉLIO et al., 2010), mas a detecção do motivo W-Box em ambos (pAox1 e pAox2b1), bZIP (no promotor pAox1), L-Box e TC-rich repeat (pAox2b1) nos promotores analisados fortalece a idéia de que Aox está envolvida na resposta e regulação causada por estresse biótico e corrobora com o que foi visualizado nos ensaios de expressão gênica desse estudo. Motivos como W-Box foi encontrado em outros genes Aox que respondem a estresse causado por patógenos ou na presença de ácido salicílico como: Aox1a de *Citrus sinensis*, Aox2b de *Glycine max*, Aox1a e Aox1b de *Arabidopsis thaliana* (THIRKETTLE-Walts et al., 2003; HO et al., 2008; DAURELIO et al., 2009). Além desse, o motivo regulatório bZIP encontrado nos genes Aox de *Medicago sativa* está também presente no gene NPR1 de *Arabidopsis thaliana* no qual ativando genes PR e sendo mediador da resposta sistêmica adquirida (SAR, sigla em inglês) (DONG, 2001; Pieterse et al., 2004).

O estresse hídrico, causado por PEG, foi mostrado que o aumento dos transcritos de Aox em *Medicago sativa*. Elementos regulatórios encontrados nos promotores analisados (pAox1 e pAox2b1) de *Medicago sativa*, como MYB, MYC, ABRE e bZIP, em pAox1, podem explicar o aumento observado nos transcritos de Aox. ABRE (Abscisic acid responsive element) motivo é responsivo a ácido absicico. Este hormônio vegetal é importante para a resistência e adaptação da planta a condições de estresse abiótico como estresses: hídrico e salino. Em plantas de *Arabidopsis thaliana*, o gene RB29D (fortemente induzido por desidratação) é controlado pela presença de ácido absicico (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994). Em tabaco, a expressão desse gene RB29D é necessário a presença de dois motivos ABRE na resposta da planta a condições de desidratação (Uno et al., 2000). Na presença de peróxido de hidrogênio, Aox em *Medicago sativa* teve expressão aumentada. Estudos com Aox1a de *Arabidopsis thaliana* deletando regiões do promotor desse gene e submetendo a agentes inibitórios do complexo III (antimicina A) e monofluoracetato (MFA:

inibidor da aconitase do ciclo do ácido tricarboxílico) que aumentam espécies reativas de oxigênio mostram a presença de elementos regulatórios compartilhados entre os promotores AtAox1a e de Aox1 e Aox2b1 de *Medicago sativa*. Um desses elementos regulatórios em comum é CCAAT Box. Este elemento cis é comumente encontrado em promotores de genes de eucariotos estando envolvido na indução e regulação da expressão de genes do complexo respiratório mitocondrial (SCHULLER, 2003). Em plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* apresentando deleção da região do promotor do gene Aox1a que contém esse elemento verificou-se que houve uma redução na indução do gene AtAox1a na presença de antimicina A e monofluoroacetato (DOJCINOVIC et al., 2005). Em pAox2b1, foi determinado a presença de motivos como Dof motivo e G Box (membro dos elementos regulatórios com o núcleo de sequência consenso ACGT). Dof motivo é encontrado somente em promotores de plantas, mas ainda não há uma função certa para esse elemento. Contudo, é encontrado em outras Aox de plantas como em Aox1a de *Citrus sinensis* e Aox1a de *Arabidopsis thaliana* (DOJCINOVIC et al., 2005; DAURÉLIO et al., 2010). Em *Arabidopsis thaliana*, notou-se que em plantas mutantes na região do promotor que contém Dof motivo houve uma diminuição da indução dos agentes produtos de radicais livres (DOJCINOVIC et al., 2005). Quanto ao domínio G Box, este é induzido por luz, mas é tem sido importante para a ligação das proteínas pZIP no qual é atua na resposta a estresse. Em AtAox1a, mutação nos núcleos de sequência consenso ACGT (como G Box) causa a diminuição da indução na presença de agentes oxidativos (DOJCINOVIC et al., 2005). Assim, parece que os promotores de genes Aox estão repletos de elementos regulatórios capazes de induzir a expressão quando a presença de radicais livres. Essa sugestão está de acordo com o proposto para a Aox de prevenção de formação de radicais livres e como parte do sistema antioxidante (Maxwell et al., 1999; Moore et al., 2001).

6. CONCLUSÃO

Busca nos bancos de dados mostraram a presença de uma família multigênica em *Medicago truncatula* (1 isoforma Aox tipo1 e 3 isoformas Aox tipo 2). Nessa família observou-se a duplicação dos genes Aox2b em Aox2b1 e Aox2b2. De forma semelhante, vimos que em *Medicago sativa* ocorreu uma segregação dos genes Aox, com duplicação dos genes Aox2b, como em *Medicago truncatula*. Nossos resultados mostraram que em *Medicago truncatula* os genes Aox1 e (ambos) Aox2b estão no mesmo cromossomo.

Quanto os resultados de expressão gênica, nossos resultados mostraram que: Aox1 é co-expresso com ambos Aox2b duplicados (Aox2b1 e Aox2b2) em situações de estresse. A presença de elementos regulatórios em comuns na região promotora de Aox1 e Aox2b (2b1) de *Medicago sativa* sugerem a co-regulação na expressão da família multigênica da Aox. Contudo, estudos de mutação sitio dirigida nos promotores dos genes Aox são necessários para a verificação da real participação desses cis-elementos na regulação da expressão gênica.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Plant Biology*. v.55, p. 297-308, 2004.

ARNHOLDT-SCHMITT, B.; COSTA, J.H.; FERNANDES DE MELO, D. AOX – a functional marker for efficient cell reprogramming under stress?. *Trends in Plant Science*. V.11, p.281–287, 2006.

ATKIN, O.K.; MACHEREL, D. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Annals of Botany*. v.103, p. 581 – 597, 2009.

BARTOLI, C.G.; GOMEZ, F.; GERGOFF, G.; GUIAMÉT, J.J.; PUNTARULO, S. Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *J Exp Bot*. v56(415), p.1269-1276 ,2005

BERNARD, V.; BRUNAUD, V.; LECHARNY, A. TC-motifs at the TATA-box expected position in plant genes: a novel class of motifs involved in the transcription regulation. *BMC Genomics*. V. 11, p. 166-181, 2010.

BERTHOLD, D.A.; ANDERSSON, M.E.; NORDLUND, P. New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochim Biophys Acta*. v.1460 p. 241–254, 2000.

BERTHOLD, D.A.; SENMARK, P. Membrane-bound diiron carboxylate proteins. *Annual Review of Plant Biology*. V.54, p. 497-517, 2003.

CASTILLO-DAVIS, C.I.; MEKHEDOV, S.L.; HARTL, D.L.; KOONIN, E.V.; KONDRASHOV, F.A. Selection for short introns in highly expressed genes. *Nat Genet* v. 31, p. 415–428, 2002.

CHEN, J.; SUN, M.; HURST, L.D.; CARMICHAEL, G.G.; ROWLEY, J.D. Human antisense genes have unusually short introns: evidence for selection for rapid transcription. *Trends Genet.* V.21, p. 203–207, 2005.

PIETERSE, C.M.J.; VAN LOON, L.C. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* v. 7, p.456–464, 2005.

COSTA, J.H.; JOLIVET, Y.; HASENFRATZ-SAUDER, M.P.; ORELLANO, E.G.; DA GUIA SILVA LIMA, M.; DIZENGREMEL, P.; DE MELO, D.F. Identification in *Vigna unguiculata* (L.) walp. Of two cDNAs encoding mitochondrial alternative oxidase orthologous to soybean alternative oxidase genes 2a and 2b. *Plant Science* v.167, p.233-239, 2004.

COSTA, J.H.; JOLIVET, Y.; HASENFRATZ-SAUDER, M.P.; ORELLANO, E.G.; SILVA LIMA, M.G.; DIZENGREMEL, P.; FERNANDES DE MELO, D. Alternative oxidase regulation in roots of *Vigna unguiculata* cultivars differing in drought/salt tolerance. *J Plant Physiol.* V.164, p.718–727, 2007.

Costa JH, Cardoso HC, Campos MD, Zavattieri A, Frederico AM, Fernandes de Melo D, et al. *Daucus carota* L. – an old model for cell reprogramming gains new importance through a novel expansion pattern of alternative oxidase (Aox) genes. *Plant Physiol Biochem* v.47, p.753–759, 2009a.

COSTA, J.H.; FERNANDES DE MELO, D.; GOUVEIA, Z.; CARDOSO, H.G.; PEIXE, A.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. The alternative oxidase family of *Vitis vinifera* reveals an attractive model to study the importance of genomic design. *Physiol Plant*; doi:10.1111/j.1399-3054.2009.01267.x, 2009b

COSTA, J.H.; MOTA, E.F.; CAMBURSANO, M.V.; LAUXMANN, M.A.; DE OLIVEIRA, L.M.; SILVA LIMA, M.D.A.G.; ORELLANO, E.G.; FERNANDES DE MELO, D. Stress-induced co-expression of two alternative oxidase (VuAox1 and 2b) genes in *Vigna unguiculata*. *Journal of Plant Physiol.* V.167(7), p.561-570, 2010.

CLIFTON, R.; LISTER, R.; PARKER, K.L.; SAPPL, P.G.; ELHAFEZ, D.; MILLAR, A.H.; DAY, A.D.; WHELAN, J. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* V.58, p. 193-212, 2005.

CLIFTON, R.; MILLAR, A.H.; WHELAN, J. Alternative oxidases in *Arabidopsis*: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochim Biophys Acta* v. 1757, p.730–741, 2006.

CONSIDINE, M.J.; HOLTZAPFFEL, R.C.; DAY, D.A.; WHELAN, J.; MILLAR, A.H. Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiology*. v.129, p949–953. 2002

DAURELIO, L.D.; CHECA, S.K.; BARRIO, J.M.; OTTADO, J.; ORELLANO, E.G. Characterization of *Citrus sinensis* type 1 mitochondrial alternative oxidase and expression analysis in biotic stress. *Biosci Rep*. V. 30(1), p.59-71, 2009.

DJAJANEGARA, I.; FINNEGAN, P.M.; MATHIEU, C.; MCCABE, T.; WHELAN, J.; DAY, D.A. Regulation of alternative oxidase gene expression in soybean. *Plant Mol Biol* v. 10, p. 735–742, 2002.

DOJCINOVIC, D.; KROSTING, J.; HARRIS, A.J.; WAGNER, D.J.; RHOADS, D.M. Identification of a region of the *Arabidopsis AtAox1a* promoter necessary for mitochondrial retrograde regulation of expression. *Plant Molecular Biology*. V.58: p.478-485, 2005

DONG X: Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Curr Opin Plant Biol*. V.4, p. 309-314, 2001.

ELHAFEZ, D.; MURCHA, M.W.; CLIFTON, R.; SOOLE, K.L.; DAY, D.A.; WHELAN, J. Characterisation of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis*:

intraorganelle location and expression. *Plant Cell Physiol.* V. 47, p. 43–54, 2005.

ELTHON, T.E.; NICKELS, R.L.; MCINTOSH, L. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiology.* V. 89, p. 1311-1313, 1989.

EMBRAPA. Tecnologias para a produção de alfafa no Rio Grande do Sul. 1ª edição. Versão on line. 2008.

FAUTEUX, F.; STRÖMVIK, M.V. Seed storage protein gene promoters contain conserved DNA motifs in Brassicaceae, Fabaceae and Poaceae. *BMC Plant Biology.* V.9, p.126, 2009.

FINNEGAN, P.M.; WHELAN, J.; MILLAR, A.H.; ZHANG, Q.; SMITH, M.K.; WISKICH, J.T. Differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase. *Plant Physiol.* V. 114, p.455–466, 1997.

FREDERICO, A.M.; ZAVATTIERI, A.; CAMPOS, M.D.; CARDOSO, H.C.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. The gymnosperm *Pinus pinaster* contains both AOX gene subfamilies, AOX1 and AOX2. *Physiol Plant* doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01279.x, 2009.

FUNG, R.W.M.; WANG, C.Y.; SMITH, D.L.; GROSS, K.C.; TAO, Y.; TIAN, M. Characterization of alternative oxidase (AOX) gene expression in response to methyl salicylate and methyl jasmonate pre-treatment and low temperature in tomatoes. *Journal of Plant Physiology.* V. 163, p. 1049-1060, 2006.

GIRAUD, E.; HO, L.H.M.; CLIFTON, R.; CARROLL, A.; ESTAVILLO, G.; TAN, Y-F.; HOWELL, K.; IVANOVA, A.; POGSON, B.J.; MILLAR, A.H.; WHELAN, J. The absence of ALTERNATIVE OXIDASE1A in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiology* v. 147, p. 595–610, 2008.

GOMBLITZA, S.; DUBUIS, P.H.; THULKE, O.; WELZL, G.; BOVET, M.; GOTZ, M.; AFFENZELLER, B.; GEIST, B.; HELN, A.; ASNAGHI, C.; MAYER, K.F.; MAUCH, F.E.;

SCCHAFFNER, A.R. Crosstalk at the transcriptional level of effector genes from secondary metabolism. *Plant Molecular Biology*. V.54, p. 817-835, 2004

GONZALEZ-MELER, M.A; RIBAS-CARBO, M.; GILES, L.; SIEDOW, J.N. The effect of growth and measurement temperature on the activity of the alternative respiratory pathway. *Plant Physiol* v. 120, p.765–772, 1999.

GRAY, G.R.; MAXWELL, D.P.; VILLARIMO, A.R. Mitochondrial/nucleus signaling of alternative oxidase gene expression occurs through distinct pathways involving organic acids and reactive oxygen species. *Physiology and Biochemistry* v.23, p. 497-503, 2004.

HANQING, F.; KUN, S.; MINGQUAN, L.; HONGYU, L.; XIN, L.; YAN, L.; YIFENG, W. The expression, function and regulation of mitochondrial alternative oxidase under biotic stresses. *Molecular Plant Pathology*. V.11(3), p. 429-440, 2010.

HERSHBERG, R.; YEGER-LOTEM, E.; MARGALIT, H. Chromosomal organization is shaped by the transcriptional regulatory network. *Trends Genet*. V.21, p.138–142, 2005

HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWAMOTO, M.; KORENAGA, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res*. v. 27, p.297–300, 1999.

HO, L.H.M.; GIRAUD, E.; LISTER, R.; THIRKETTLE-WATTS, D.; LOW, J.; CLIFTON, R.; HOWELL, K.A.; CARRIE, C.; DONALD, T.; WHELAN, J. Characterization of the regulatory and expression context of an alternative oxidase gene provides insights into cyanide-insensitive respiration during growth and development. *Plant Physiol* v.143, p.1519 – 1533, 2007

HO, L.H.M.; GIRAUD, E.; UGGALLA, V.; LISTER, R.; CLIFTON, R.; GLEN, A.; THIRKETTLE-WATTS, D.; VAN AKEN, O.; WHELAN, J. Identification of Regulatory Pathways Controlling Gene Expression of Stress-Responsive Mitochondrial Proteins in *Arabidopsis*. Vol. 147, p. 1858–1873, 2008.

HOLTZAPFFEL, R.C.; CASTELI, J.; FINNEGAN, P.M.; MILLAR, A.H.; WHELAN, J.; DAY, D.A. A tomato alternative oxidase protein with altered regulatory properties. *Biochim Biophys Acta* v.1606, p.153–162, 2003.

HUANG, N.; SUTLIFF, T.D.; LITTS, J.C.; RODRIGUEZ, R.L. Classification and characterization of the rice alpha-amylase multigene family. *Plant Molecular Biology*. V.14(5), p655-668, 1990.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*. V. 9(9), p. 868-877, 1999.

ITO, Y.; SAIKO, D.; NAKAZONO, M.; TSUTSUMI, N.; HIRAI, A. Transcript levels of tandem-arranged alternative oxidase genes in Rice are increased by low temperature. *Genes*. V.203, p. 121-129, 1997

ITO-INABA, Y.; HIDA, Y.; INABA, T. What is critical for plant thermogenesis? Differences in mitochondrial activity and protein expression between thermogenic and non-thermogenic skunk cabbages. *Planta*. V.231(1), p.121-130, 2009.

JOB, C.; RAJJOU, L.; LOVIGNY, Y.; BELGHAZI, M.; JOB, D. Patterns of protein oxidation in arabidopsis seeds and during germination. *Plant Physiol* V.138, p.790–802, 2005.

KARPOVA, O.V.; KUZMIM, E.V.; ELTHON, T.E.; NEWTON, H.J. Differential expression of alternative oxidase genes in maize mitochondrial mutants. *Plant Cell* V.14, p. 3271-3284, 2002.

KURTZ, A.M.; SOLL, D. Arabidopsis alternative oxidase sustains Escherichia coli respiration. *Proc Natl Acad Sci USA*. V.89, p.10842-10846, 1997.

LESCOT, M.; DEHAIS, P.; THUIS, G.; MARCHAL, K.; MOREAU, Y.; VAN DE PEER, Y.;

ROUZE, P.; ROMBAUTS, S. PlantCare, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* v. 30, p.325–327, 2002.

MATOS, A.R.; MENDES, A.T.; SCOTTI-CAMPOS, P.; ARRABAÇA, J.D. Study of the effects of salicylic acid on soybean mitochondrial lipids and respiratory properties using the alternative oxidase as a stress-reporter protein. *Physiol Plant.* V.137(4), p. 485-497, 2009.

MAXWELL, D.P.; WANG, Y.; MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* V. 96, p. 8271–8276, 1999.

MEEUSE, B.J.D. Thermogenic respiration in aroids. *Annual Review of Plant Physiology.* V.26, p. 117-126, 1975

MCINTOSH, L.; EICHLER, T.; GRAY, G.; MAXWELL, D.; NICKELS, R.; WANG, Y. Biochemical and genetic controls exerted by plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta: Bioenerg.* v.1365, p. 278 – 284, 1998.

MILLAR, A.H.; HEAZLEWOOD, J.L.; KRISTENSEN, B.K.; BRAUN, H.P; MØLLER, I.M. The plant mitochondrial proteome. *Trends Plant Sci.* V.10(1), p.36-43, 2005.

MØLLER, I.M.; RASMUSSEN, A.G.; SIEDOW, J.J.; VANLERBERGHE, G.C. The product of the alternative oxidase is still H₂O. *Arch Biochem Biophys.* V.495(1), p.93-94, 2010.

NAKABAYASHI, K.; OKAMOTO, M.; KOSHIBA, T.; KAMIYA, Y.; NAMBARA, E. Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant Journal.* V.41(5), p. 697-709, 2005.

NAYDENOV, G.N.; KHANAM, S.M.; ATANASSOV, A.; NAKAMURA, C. Expression profile of respiratory components associated with mitochondrial biogenesis during germination and seedling growth under normal and restricted conditions in wheat. *Gene Genet. System.* V. 83, p. 31-41, 2008.

POLIDOROS, A.N.; MYLONA, P.V.; PASENTSIS, K.; SCANDALIOS, J.G.; TSAFTARIS, A.S. The maize alternative oxidase 1a (Aox1a) gene is regulated by signals related to oxidative stress. *Redox Rep.* V. 10, p.71 – 78, 2005.

POLIDOROS, A.N.; MYLONA, P.V.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. Aox gene structure, transcript variation and expression in plants. *Physiol Plant.* V.137(4), p.342-353, 2009.

RHOADS, D.M.; MCINTOSH, L. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an alternative oxidase protein of *Sauromatum guttatum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V.88, p. 2122-2126, 1991.

RIZHSKY, L.; HONGJIAN, LIANG.; SHUMAN, J.; VSHULAEV, V.; DAVLETOVA, S.; MITTLER, R. When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. *Plant Physiology*, Vol. 134, p.1683–1696, 2004

SAIBRO, J.C. Produção de alfafa no Rio Grande do Sul. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 7., 1984, Piracicaba. Anais. Piracicaba: FEALQ, 1985. p. 61-106.

SAISHO, D.; NAMBARA, E.; NAITO, S.; TSUTSUMI, N.; HIRAI, A.; NAKAZONO, M. Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* V.35, p.585–596, 1997.

SCHULLER, H.J. Transcriptional control of non fermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* V.43, p.139-160, 2003.

TAIZ, L., ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4^a ed. ARTMED. Capítulo 20, 2009.

TANUDJI, M.; SJOLING, S.; GLASER, E.; WHELAN, J. Signals required for the import and processing of the alternative oxidase into mitochondria. *J Biol Chem* v.274, p.1286–1293, 1999.

THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. V.408, p. 796-815, 2000

THIRKETTLE-WATTS, D.; MCCABE, T.C.; CLIFTON, R.; MOORE, C.; FINNEGAN, P.M.; DAY, D.A.; WHELAN, J. Analysis of the alternative oxidase promoters from soybean. *Plant Physiol*. V. 133, p.1158–1169, 2003.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. V. 25, p, 4876-4882, 1997

UNO, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 97, p.11632–11637, 2000.

UMBACH, A.L.; NG, V.S., SIEDOW, J.N. Regulation of plant alternative oxidase activity: a tale of two cysteines. *Biochim Biophys Acta* v. 13 , p.1757, 2006.

VAN AKEN, O.; GIRAUD, E.; CLIFTON, R.; WHELAN, J. Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses. *Physiol Plant* doi: 10.1111/j.1399-3054. 2009.01240.x, 2009.

VANLERBERGHE, G.C.; MCINTOSH, L. Alternative oxidase: from gene to function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* v. 48, p.703 – 734, 1997.

VANLERBERGHE, G.C.; CVETKOVSKA, M.; WANG, J. Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? *Physiol Plant* doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01254.x, 2009

VIANA, M.C.M.; PURCINI, H.M.A.; KONZEN, E.A.; BOTREL, M.A.; GIANASI, L.; MASCARENHAS, M.H.T.; FREIRE, F.M. Avaliação de cultivares de alfafa nas condições de Cerrado no Estado de Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 39(3), p. 289-292, 2004.

WATANABE, C.K.; HACHIYA, T.; TERASHIMA, I.; NOGUCHI, K. The lack of alternative oxidase at low temperature leads to a disruption of the balance in carbon and nitrogen metabolism, and to an up-regulation of antioxidant defence systems in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Cell Environ*. V.31(8), p.1190-1202, 2008.

WHELAN, J.; MILLAR, A.H.; DAY, D.A. The alternative oxidase is encoded in a multigene family in soybean. *Planta* v.198, p.197–201, 1996.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* v.6, p. 251–264, 1994.