
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)**

**O ÁCIDO HEXANOICO PODE MODULAR O METABOLISMO
ANTIOXIDANTE E O METABOLISMO NITROSATIVO EM CAFEIRO**

NATÁLIA FERMINO CALZADO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Abril - 2019

NATÁLIA FERMINO CALZADO

O ÁCIDO HEXANOICO PODE MODULAR O METABOLISMO ANTIOXIDANTE E O
METABOLISMO NITROSATIVO EM CAFEIEIRO

Orientador: Douglas Silva Domingues

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
- Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de mestre
em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal)

Rio Claro
2019

C171a Calzado, Natália
O ácido hexanoico pode modular o metabolismo antioxidante e o metabolismo nitrosativo em cafeeiro / Natália Calzado. -- Rio Claro, 2019
73 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Douglas Silva Domingues

1. Óxido nítrico. 2. ácido hexanoico. 3. Coffea arabica.
4. espécies reativas de oxigênio. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

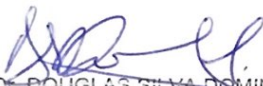
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

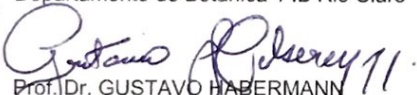
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: O ÁCIDO HEXANOICO PODE MODULAR A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NITRICO NO CAFEIEIRO?

AUTORA: NATÁLIA FERMINO CALZADO

ORIENTADOR: DOUGLAS SILVA DOMINGUES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA VEGETAL), área: Biologia Vegetal pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. DOUGLAS SILVA DOMINGUES
Departamento de Botânica / IB Rio Claro


Prof. Dr. GUSTAVO HABERMANN
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Profª. Dra. MARÍLIA GASPAR
Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica / Depto. Fisiologia/ Bioquímica - Instituto de Botânica/SÃO PAULO

Rio Claro, 24 de abril de 2019

Título alterado para:

O ácido hexanoico pode modular o metabolismo antioxidante e o metabolismo nitrosativo em cafeeiro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais. Sem o apoio deles, desde o momento em que decidi fazer o curso de biologia, nada disso seria possível. Amo vocês!

Ao grupo Getransplant por dividir comigo tantos bons momentos no laboratório. Agradeço especialmente a Paula por ser tão presente e companheira desde o primeiro mês do meu mestrado. Foram muitas disciplinas e experimentos juntas, e tudo isso com o bebê Davi, nosso IC mais lindo! Sem o apoio, as conversas, risadas e trocas de experiências profissionais e pessoais, o meu mestrado não seria o mesmo. Agradeço especialmente também a Suzana, que me recebeu tão bem em Londrina e mesmo de longe sempre me ajudou. Encontrar vocês duas foi uma das melhores partes do mestrado.

Ao namorado Danilo que mais uma vez me ajudou em todos os momentos dessa etapa. Foram muitas caronas para comprar nitrogênio líquido, muitas noites no laboratório me fazendo companhia para eu não ser a única no departamento e medidas de pH nos finais de semana. Sem seu carinho e companherismo eu não teria força para continuar. Agradeço também a minha sogra Diná por ser sempre presente e sempre tentar me animar.

Ao Departamento de Botânica e seus funcionários pelo espaço e ajuda.

Ao Prof. Dr. Halley Caixeta por me receber em Londrina e me ajudar com as análises de óxido nítrico. À Dra. Salete Gaziola por me receber tão bem na ESALQ ao longo de várias semanas e me ajudar e ensinar a fazer as análises bioquímicas. À Dra. Amedea Seabra pela parceria e pelas análises realizadas na UFABC.

A orientação do Prof. Douglas Silva Domingues e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo por financiar nosso projeto (processo FAPESP 2016/10896-0). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Muito obrigada!

RESUMO

As plantas em seu ambiente respondem a uma infinidade complexa de fatores que podem romper sua homeostase fisiológica. Com relação aos estresses abióticos, a capacidade de organismos vegetais responderem a esses estresses é flexível e depende do balanceamento da interação entre moléculas de sinalização. Destacam-se entre as moléculas sinalizadoras em plantas as espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), que estão envolvidos na aclimação a estresses abióticos. O transporte, a biossíntese e o metabolismo de EROs e ERNs influenciam os mecanismos de resposta das plantas ao ambiente. Um elemento chave na geração de EROs em plantas são as NADPH oxidases, que são enzimas codificadas por uma família gênica em plantas, pouco estudada do ponto de vista evolutivo. Já um elemento regulador importante da homeostase de ERNs em plantas são as S-nitrosoglutationa redutases, enzimas também pouco estudadas do ponto de vista evolutivo. Nos últimos anos, diversos trabalhos sugerem que as plantas podem ser elicitadas por compostos químicos para melhor tolerar estresses abióticos. No entanto, os mecanismos de reprogramação fisiológica e transcricional por trás destes sinalizadores ainda são pouco conhecidos.

O ácido hexanoico é um ácido carboxílico que, em baixas concentrações, possui um efeito indutor de resistência e modulador do metabolismo em diversos sistemas vegetais. No entanto, o impacto do ácido hexanoico na geração de EROs e de ERNs nunca foi avaliado.

Neste projeto, testamos a hipótese de que o ácido hexanoico pode induzir a produção de EROs e ERNs em sistemas vegetais, por meio de sua aplicação em cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *C. arabica* é um sistema vegetal tetraploide que, a despeito de sua importância econômica e social no Brasil e em países em desenvolvimento, carece de estudos bioquímicos e moleculares com impacto em sua fisiologia.

Identificamos *in silico* genes codificantes para enzimas chave no processo de formação de EROs e ERNs, Rboh e GSNOR, para as espécies *Coffea canephora*, *Coffea arabica*, *Coffea eugenioides* e outras 24 espécies vegetais. Para todas as espécies foi investigado o perfil de seleção evolutiva para estes genes, assim como os perfis transcricionais em espécies selecionadas.

Também avaliamos o efeito da aplicação de ácido hexanoico em solução nutritiva no metabolismo oxidativo e nitrosativo, bem como avaliamos transcricionalmente genes-chave na modulação destes processos. Observamos que a aplicação de ácido hexanoico em solução nutritiva induz a formação de peróxido de hidrogênio e S-nitrosotiosis, bem promove a modulação diferencial de genes-chave em função do subgenoma ao qual pertencem.

Com isso, o presente trabalho traz importantes subsídios para a compreensão da dinâmica molecular de eventos associados à aclimação ao estresse mediados por eliciadores químicos.

Palavras-chave: Óxido nítrico, ácido hexanoico, *Coffea arabica*, espécies reativas de oxigênio

ABSTRACT

Plants in their environment respond to a complex infinity of factors that can interfere their physiological homeostasis. Regarding abiotic stresses, the ability of plants to respond to these stresses is flexible and depends on balancing the interaction among signaling molecules. Among the signaling molecules in plants, we highlight reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), which are involved in acclimatization to abiotic stresses. The transport, biosynthesis and metabolism of ROS and ERNs influence plant response mechanisms to the environment. A key element in the generation of EROs in plants are NADPH oxidases, which are enzymes encoded by a gene family in plants, that is scarcely studied in an evolutionary approach. An important regulator of the homeostasis of plant ERNs is S-nitrosoglutathione reductase, which is also a poorly addressed enzyme in terms of evolutionary studies. Recently, several studies have suggested that plants can be elicited by chemical compounds, to better tolerate abiotic stresses. However, the mechanisms of physiological and transcriptional reprogramming behind these signaling molecules are still poorly understood.

Hexanoic acid is a carboxylic acid, which, at low concentrations, can induce resistance to stresses and it can also modulate metabolism on numerous plant systems. However, the impact of hexanoic acid on the generation of ROS and ERNs has never been evaluated.

In this project, we tested the hypothesis if hexanoic acid can induce the production of ROS and ERNs in plant systems, through its application in coffee plants (*Coffea arabica* L.). *C. arabica* is a tetraploid plant that, despite its economic and social importance in Brazil and in developing countries, lacks biochemical and molecular studies with impact on its physiology.

We identified *in silico* genes encoding key enzymes in the process of formation of EROs and ERNs, Rboh and GSNOR, in *C. canephora*, *C. arabica*, *C. eugenioides* and 24 other plant species. For all species, the evolutionary selection profile for these genes was investigated, as well as the transcriptional profiles in selected species.

We also evaluated the effect of the application of hexanoic acid in nutrient solution on oxidative and nitrosative metabolism, as well as evaluated transcriptional patterns of key genes in the modulation of these processes in *C. arabica*. We observed that the application of hexanoic acid in nutrient solution induces the formation of hydrogen peroxide and S-nitrosothiols, as well as differentially modulate of key genes in function of the subgenome to which they belong.

Overall, the present work provides important insights on the understanding of the molecular dynamics of events associated with acclimatization to stress mediated by chemical elicitors.

Keywords: Nitric oxide, hexanoic acid, *Coffea arabica*, reactive oxygen species.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	07
1.1	Objetivos.....	13
1.2	Referências.....	14
2	CAPÍTULO 2 - ANÁLISES GENÔMICAS E EVOLUTIVAS DE S- NITROSOGLUTATIONA REDUTASE (gsnor) EM ANGIOSPERMAS	17
2.1	Introdução.....	17
2.2	Objetivos.....	18
2.3	Materiais e métodos.....	19
2.4	Resultados e discussão.....	21
2.5	Conclusão.....	30
2.6	Referências.....	31
3	CAPÍTULO 3 - ANÁLISES GENÔMICAS E EVOLUTIVAS DE NADPH OXIDASE (RBOH) EM ANGIOSPERMAS	33
3.1	Introdução.....	33
3.2	Objetivos.....	34
3.3	Materiais e métodos.....	34
3.3	Resultados e discussão.....	36
3.4	Conclusão.....	50
3.5	Referências.....	51
4	CAPÍTULO 4 - O ÁCIDO HEXANOICO É CAPAZ DE MODULAR EROS E ERNS EM <i>COFFEA ARABICA</i> ?	53
4.1	Introdução.....	53
4.2	Objetivos.....	55
4.3	Materiais e métodos.....	55
4.3	Resultados e discussão.....	61
4.4	Conclusão.....	70
4.5	Referências.....	70
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74

Introdução

1.1 Café: aspectos gerais

O café é um dos principais produtos do sistema agroindustrial brasileiro e mundial. Apesar da sua importância econômica, comparativamente, o café é alvo de poucos estudos científicos. O gênero *Coffea* pertence à família Rubiaceae, subfamília Ixoroidaeae, e possui 124 espécies (Davis et al., 2011). As espécies mais comercializadas são *Coffea arabica* (conhecido como café arabica) e *Coffea canephora* (conhecido como Robusta ou Conilon).

A espécie *Coffea arabica* é originária do sudeste da Etiópia e é a única espécie tetraploide do gênero ($2n = 2x = 44$ cromossomos) (Clarindo e Carvalho, 2008). O genoma de *C. arabica* tem provável origem na fusão, ocorrida há menos de 1 milhão de anos, entre as espécies diploides *Coffea canephora* e *Coffea eugenioides* (Yu et al., 2011). Em espécies alotetraploides, como *C. arabica*, espera-se que a maioria dos genes esteja presente em duas cópias homeólogas, altamente similares, mas não idênticas (Petitot et al., 2008; Glover et al., 2016).

A duplicação de genes em alotetraploides pode conferir uma vantagem na adaptação em novos ambientes e a especialização dos genes duplicados (Jackson e Chen, 2010). Os genes duplicados respondem à pressão evolutiva podendo ser silenciados, se manterem com a mesma função original ou podem apresentar padrões de expressão gênica divergentes entre si, variando a expressão gênica de acordo com o órgão/tecido ou a resposta ambiental (De Carvalho et al., 2014; Leal-Bertioli et al., 2017; Liang e Schnable, 2018; Lloyd et al., 2018; Abeysinghe et al., 2019).

1.2 Estresse oxidativo e nitrosativo

1.2.1 Espécies reativas de oxigênio: origem e regulação

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas instáveis e altamente reativas, formadas pela redução incompleta de O_2 em H_2O , com capacidade de transformar outras moléculas com as quais colidem. Elas contêm radicais superóxidos (O_2^-), que em níveis atenuados podem atuar como sinalizadores moleculares em diversas situações fisiológicas (Mittler, 2017). Entretanto, a geração excessiva de EROs pode causar danos a proteínas, clorofila, DNA, vazamento iônico e pode levar a morte celular (Del Castello et al., 2019). A

produção e degradação de EROs pode ocorrer na membrana plasmática, mitocôndria, cloroplasto, retículo endoplasmático e peroxissomas (Van Breusegem et al, 2018; Czarnocka e Karpiński, 2018).

Em plantas, a principal fonte de EROs é proveniente da oxidação de NADPH catalisada por O_2^- (Marino et al., 2013; Cheng et al., 2013, Figura 1). O NADPH funciona como um doador de elétrons citosólico ao reduzir o O_2 extracelular. NADPH oxidases são proteínas membranares, que por meio da fosforilação de seu domínio N-terminal doam um elétron para O_2 , gerando assim o superóxido (O_2^-). NADPH oxidases são codificadas por uma família gênica denominada, em inglês, “*Respiratory burst oxidase homologs*” (Rboh) (Marino et al., 2012; Cheng et al., 2013). Em *Arabidopsis thaliana* ocorrem 10 genes na família gênica Rboh (RbohA-RbohJ). Nas folhas, AtrbohD gera EROs relacionadas ao reconhecimento de patógenos. RbohF age em conjunto com RbohD em respostas moleculares a patógenos, e em processos de morte celular. RbohF também atua elevando níveis de Ca^{2+} para a sinalização de células-guarda, regulando a abertura e fechamento de estômatos (Torres et al., 2005; Kaya et al., 2018). RbohD e RbohF são expressos principalmente em tecidos da parte aérea da planta e promovem uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo favorecendo a imunidade vegetal (Angelos et al., 2018). As funções de cada homólogo da família gênica Rboh no crescimento e desenvolvimento vegetal, é tecido específica. Estudos do perfil transcricional da família gênica Rboh em *Arabidopsis thaliana*, indicam que RbohC, RbohD e RbohF estão relacionadas a desenvolvimento e alongamento de raiz, formação de raízes laterais. RbohD e RbohF também estão relacionadas ao fechamento estomático. RbohB atua durante o amadurecimento de sementes. RbohH e RbohJ estão relacionadas ao crescimento do tubo polínico. RbohE atua no desenvolvimento da antera e pólen (Chapman et al., 2019).

1.2.2 Espécies reativas de nitrogênio: origem e regulação

1.2.2.1 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, sem carga que possui elétrons despareados permitindo que atue como um sinalizador molecular envolvido em diversos processos biológicos como crescimento radicular, fechamento estomático, germinação e resposta a fatores de estresse biótico ou abiótico (Kovacs et al., 2016; Lindermayr, 2018) e ao alterar o estado redox de outras biomoléculas (Frunghillo et al., 2014). O NO faz parte de uma família de moléculas reativas de nitrogênio (ERNs), o qual inclui também o grupo S-nitrosotiol (SNOs)

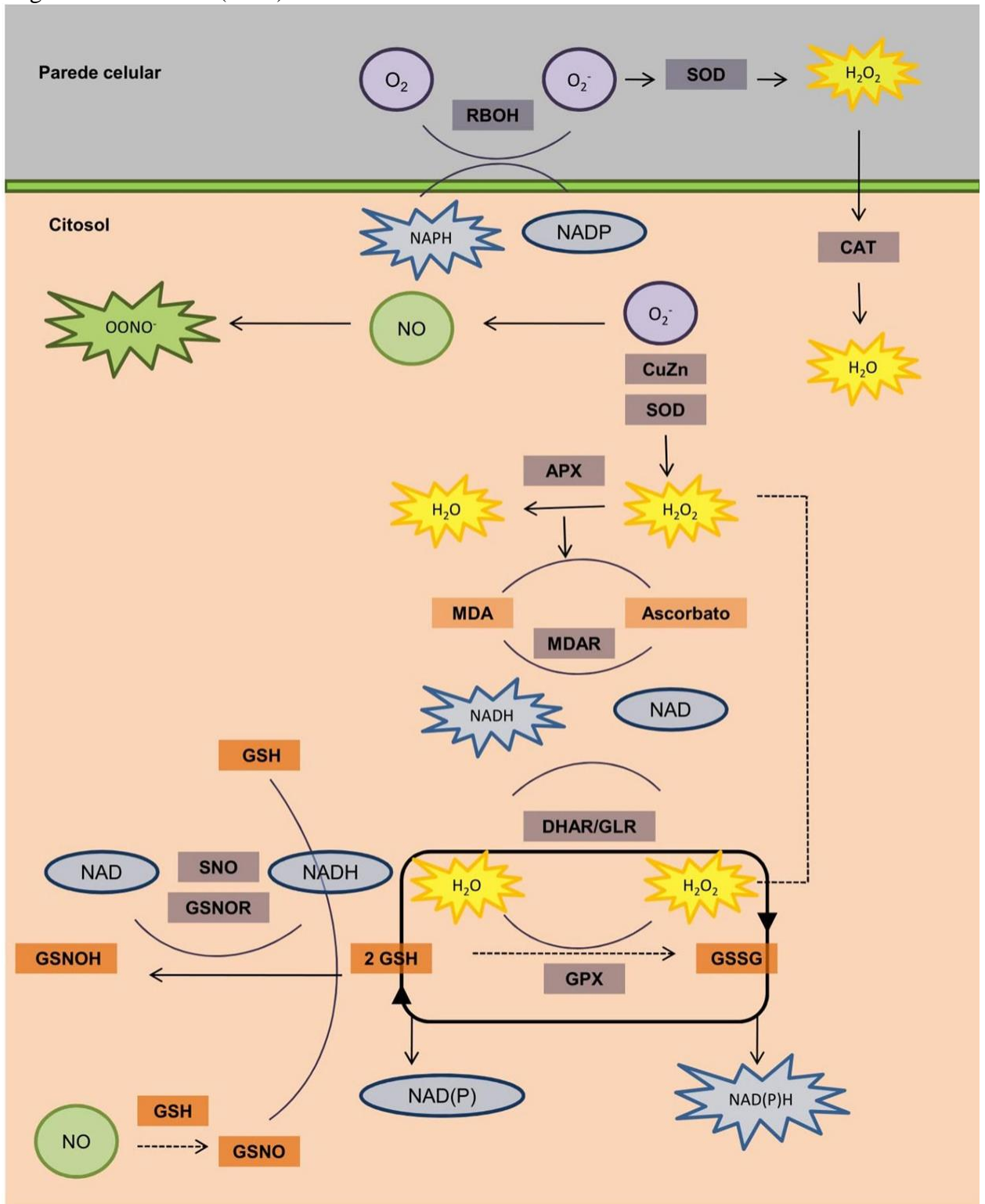
(Leterrier et al., 2011; Lindermayr, 2018; Jahnova et al., 2019). A bioprodução de NO se dá por vias enzimáticas e não enzimáticas, como por exemplo, a redução de nitrato no citosol ou a redução de nitrito nas cadeias de transporte de elétrons nas mitocôndrias e cloroplastos (Jahnova et al., 2019). A presença de elétrons despareados faz com que o NO faça parte das espécies reativas de nitrogênio (ERNs). O NO pode interagir com superóxido formando peroxinitrito (ONOO^-), molécula reativa que pode causar danos ao DNA, proteínas e lipídeos. A presença de NO e ONOO^- combinada com altos níveis de H_2O_2 em situações de quebra da homeostase, faz com que o O_2^- seja menos tóxico para a célula. Assim como as EROs, o NO tem um papel de proteção celular, apesar de ser tóxico quando produzido excessivamente (Del Castello et al., 2019).

Os SNOs são importantes moléculas estáveis que servem como fonte de reserva e transporte de NO em plantas (Jahnova et al., 2019). Eles são formados por S-nitrosilação, que é uma adição seletiva e reversível da porção de óxido nítrico ao átomo de enxofre das cisteínas, que ocorre em tióis e proteínas de baixo peso molecular. A S-nitrosilação é considerada uma importante modificação pós-traducional de proteínas baseada em oxirredução, sendo parte integrante das vias de sinalização de NO e ERNs. Pode estar relacionada a diversos processos fisiológicos como regulação da homeostase, transcrição de proteínas e morte celular programada (Figura 1; Jahnova et al., 2019).

Entre os SNOs, a S-nitrosoglutaciona (GSNO), formada pela S-nitrosilação de glutaciona, é considerada o SNO mais abundante em plantas, sendo dessa forma a principal reserva móvel de NO (Leterrier et al., 2011; Jahnova et al., 2019). A enzima S-nitrosoglutaciona redutase (GSNOR) realiza a redução de GSNO, em uma reação dependente de NADH (Figura 1), e é considerada uma reação chave na mediação dos níveis celulares de GSNO e NO (Lindermayer, 2018).

Figura 1: Sinalizadores moleculares e proteínas envolvidas na regulação de estresse de célula vegetal. A proteína Rboh (*Respiratory burst oxidase homolog*) catalisa a formação de Superóxido (O_2^-) por meio da oxidação de NADPH. A superóxido dismutase (SOD) atua convertendo o O_2^- em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que posteriormente é degradado pela catalase (CAT) e por peroxidases em água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2). No interior da célula, o O_2 pode interagir com óxido nítrico (NO) formando peroxinitrito (OONO^-). Simultaneamente, a degradação de H_2O_2 pela ascorbato peroxidase (APX), ocorre a oxidação de monodehidroascorbato (MDA), gerando dehidroascorbato (DHA). O ascorbato é regenerado pela ação das enzimas monodehidroascorbato redutase (MDAR) e dehidroascorbato redutase (DHAR), utilizando glutaciona (GSH) e NADPH como doadores de elétrons. A glutaciona é oxidada gerando GSSG, por meio da ação da glutaciona peroxidase (GPX). A interação entre NO e GSH gera a S-nitrosoglutaciona (GSNO), principal reservatório de NO celular. Os níveis de GSNO são regulados pela S-nitrosoglutaciona redutase (GSNOR). Figura baseada em

Begara-Morales et al.(2016).



1.2.2.2 GSNOR

A GSNOR é uma enzima citosólica que, reduzindo GSNO, leva à formação de dissulfeto de glutathione (GSSG) e amônio (Liu et al., 2001). Inicialmente, a enzima foi caracterizada como uma formaldeído desidrogenase dependente de glutathione, que desempenha as mesmas funções enzimáticas da álcool desidrogenase do tipo III (Koivusalo et al., 1989; Sakamoto et al., 2002; Jahnova et al., 2019). No entanto, sabe-se atualmente que o substrato de maior afinidade a esta enzima é a GSNO (Staab et al., 2009; Jahnova et al., 2019).

Dados disponíveis relacionaram GSNOR a inúmeros processos metabólicos de desenvolvimento vegetal regulando a homeostase de NO. Estudos sugerem a importância da GSNOR em resposta a diversos estímulos de estresse abiótico (Salgado et al., 2013). A GSNOR em células vegetais desempenha um importante papel regulador no metabolismo geral do NO regulando os níveis de S-nitrosotios através da degradação irreversível da S-nitrosoglutathione dependente de NADH (Jahnova et al., 2019).

Esta enzima altamente conservada é codificada por um gene de cópia única em diversas plantas angiospermas. No sistema vegetal modelo *Arabidopsis thaliana*, corresponde ao gene AT5G43940, denominado genericamente de “Alcohol dehydrogenase” (Kovacs et al., 2016). A GSNOR foi purificada e caracterizada em diversas espécies vegetais, como alface, ervilha, girassol, milho, arroz e *Arabidopsis* (como revisado por Leterrier et al., 2011 e Jahnova et al., 2019). Sua atividade é modulada pela ação dos hormônios vegetais ácido jasmônico e ácido salicílico (Leterrier et al., 2011) e a expressão do gene varia de acordo com diferentes estímulos ambientais. Alterações nos níveis de GSNOR influenciam a atividade do NADH no complexo mitocondrial I, por exemplo. A GSNOR modula a atividade da cadeia respiratória em mitocôndrias e cloroplastos por meio da homeostase de NO e SNO. Além disso regula a homeostase durante o estresse redox alterando os níveis intracelulares de NADH e GSH. (Jahnova et al., 2019).

1.3 Ácido hexanoico como indutor de resistência e sinalizador

O ácido hexanoico ($C_6H_{12}O_2$) é um ácido carboxílico de seis carbonos derivado do hexano. A aplicação exógena do ácido hexanoico (Hx) em plantas é possível devido sua solubilidade em água e foi associada a uma atividade antimicrobiana, promovendo uma resposta preventiva contra fungos e bactérias patogênicos de plantas (Leyva et al., 2008). Ele é

um potente agente eliciador natural com eficiência comprovada em uma ampla gama de plantas hospedeiras e patógenos. Pode induzir a ativação precoce de defesas de amplo espectro, induzindo a deposição de calosidade e as vias de ácido salicílico e ácido jasmônico (Aranega-Bou et al, 2014).

A aplicação de baixas concentrações de Hx (até 5mM) promovem uma maior tolerância a patógenos, e concentrações mais elevadas (concentrações entre 6 e 20mM) possuem efeito fungicida e bactericida em plantas (Aranega-Bou et al, 2014). Enquanto indutor de resistência, o Hx não é tóxico para a planta; entretanto, substâncias indutoras de resistência induzem a produção de EROs e estão relacionadas com o sistema antioxidante e produção de NO em plantas (Rasul et al., 2012; Savvides et al., 2016). A indução de muitos genes que caracterizam o efeito eliciador do ácido hexanoico (Hx), especialmente aqueles relacionados à defesa e à rede de sinalização e ao controle do estresse oxidativo já foi observada em diversas espécies vegetais (Aranega-Bou et al, 2014).

O ácido hexanoico tem um efeito atenuante no estresse oxidativo. Estudos com plantas expostas a estresses bióticos e abióticos, mostram que plantas previamente tratadas com ácido hexanoico apresentam menores concentrações de EROs quando comparadas com plantas que não receberam o tratamento. Morangos (*Fragaria ananassa*) expostos a baixas temperaturas e tratados com ácido hexanoico apresentaram uma redução nas concentrações de MDA, H₂O₂ e O₂⁻, indicando um aumento na atividade de enzimas antioxidantes (Fu et al., 2011). O mesmo efeito foi observado em tomates inoculados com o patógeno *Botrytis ciniera* e em melão (*Cucumis melo*) infectados com o vírus MNSV (*melon necrotic spot virus*) (Finiti et al., 2014 e Fernández-Crespo et al., 2017)

Sendo assim, é possível especular que a produção de moléculas relacionadas ao sistema antioxidante e do óxido nítrico sejam moduladas pela aplicação de ácido hexanoico.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi:

- Avaliar se o ácido hexanoico modula a geração de EROs e ERNs em *Coffea arabica*;

Especificamente pretendeu-se:

- Identificar genes codificantes da enzima GSNOR em genomas de 27 espécies vegetais
- Avaliar qual perfil de seleção ocorre entre os genes de GSNOR;

- Identificar genes codificantes da enzima Rboh em genomas de 27 espécies vegetais
- Avaliar qual perfil de seleção ocorre entre os genes de Rboh;
- Avaliar se o perfil transcricional de RbohD em folhas maduras e raízes laterais é modulado pela aplicação de ácido hexanoico em solução nutritiva;
- Avaliar se o perfil transcricional de GSNOR em folhas maduras e raízes laterais é modulado pela aplicação de ácido hexanoico em solução nutritiva;

Referências

ABEYSINGHE, Jayami K.; LAM, Kai-Man; NG, Danny W.-K. Differential regulation and interaction of homoeologous WRKY 18 and WRKY 40 in Arabidopsis allotetraploids and biotic stress responses. *The Plant Journal*, v. 97, n. 2, p. 352-367, 2019.

ANGELOS, Evan; BRANDIZZI, Federica. NADPH oxidase activity is required for ER stress survival in plants. *The Plant Journal*, v. 96, n. 6, p. 1106-1120, 2018.

ARANEGA-BOU, Paz et al. Priming of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model. *Frontiers in plant science*, v. 5, p. 488, 2014.

BEGARA-MORALES, Juan C. et al. Antioxidant systems are regulated by nitric oxide-mediated post-translational modifications (NO-PTMs). *Frontiers in plant science*, v. 7, 2016.

CEPAUSKAS, Darius et al. Characterization of apple NADPH oxidase genes and their expression associated with oxidative stress in shoot culture in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 124, n. 3, p. 621-633, 2016.

CHAPMAN, Jordan M. et al. Rboh-dependent ROS synthesis and ROS scavenging by plant specialized metabolites to modulate plant development and stress responses. *Chemical research in toxicology*, 2019.

CHENG, Chenxia et al. Genome-wide analysis of respiratory burst oxidase homologs in grape (*Vitisvinifera* L.). *International journal of molecular sciences*, v. 14, n. 12, p. 24169-24186, 2013.

CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. First *Coffea arabica* karyogram showing that this species is a true allotetraploid. *Plant Systematics and Evolution*, v. 274, n. 3-4, p. 237, 2008.

CZARNOCKA, Weronika; KARPIŃSKI, Stanisław. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 122, p. 4-20, 2018.

DAVIS, A. et al. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 167, n. 4, p. 357-377, DEC 2011 2011.

DE CARVALHO, K. et al. Homeologous genes involved in mannitol synthesis reveal unequal contributions in response to abiotic stress in *Coffea arabica*. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 289, n. 5, p. 951-963, OCT 2014 2014.

DEL CASTELLO, Fiorella et al. The era of nitric oxide in plant biology: Twenty years tying up loose ends. *Nitric Oxide*, 2019.

FERNÁNDEZ-CRESPO, Emma et al. Hexanoic acid treatment prevents systemic MNSV movement in *Cucumis melo* plants by priming callose deposition correlating SA and OPDA accumulation. *Frontiers in plant science*, v. 8, p. 1793, 2017.

FINITI, Ivan et al. Hexanoic acid protects tomato plants against *B otrytis cinerea* by priming defence responses and reducing oxidative stress. *Molecular plant pathology*, v. 15, n. 6, p. 550-562, 2014.

FRUNGILLO, Lucas et al. S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nature Communications*, v. 5, p. 5401, 2014.

FU, X.-J. et al. Hexanoic acid 2-(diethylamino) ethyl ester enhances chilling tolerance in strawberry seedlings by impact on photosynthesis and antioxidants. *Biologia plantarum*, v. 55, n. 4, p. 793, 2011.

GLOVER, Natasha M.; REDESTIG, Henning; DESSIMOZ, Christophe. Homoeologs: what are they and how do we infer them?. *Trends in plant science*, v. 21, n. 7, p. 609-621, 2016.

JACKSON, S.; CHEN, Z. J. Genomic and expression plasticity of polyploidy. *Curr Opin Plant Biol*, v. 13, n. 2, p. 153-9, Apr 2010.

JAHNOVÁ, Jana; LUHOVÁ, Lenka; PETŘIVALSKÝ, Marek. S-Nitrosoglutathione Reductase—The Master Regulator of Protein S-Nitrosation in Plant NO Signaling. *Plants*, v. 8, n. 2, p. 48, 2019.

KAYA, Hidetaka et al. Comparative analysis of the reactive oxygen species-producing enzymatic activity of *Arabidopsis* NADPH oxidases. *The Plant Journal*, 2018.

KOIVUSALO, Martti; BAUMANN, Marc; UOTILA, Lasse. Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. *FEBS letters*, v. 257, n. 1, p. 105-109, 1989.

KOVACS, Izabella et al. ROS-Mediated Inhibition of S-nitroso glutathione Reductase Contributes to the Activation of Anti-oxidative Mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, 2016.

LEAL-BERTIOLI, Soraya CM et al. Phenotypic effects of allotetraploidization of wild *Arachis* and their implications for peanut domestication. *American journal of botany*, v. 104, n. 3, p. 379-388, 2017

LETERRIER, Marina et al. Function of S-nitroso glutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant signaling & behavior*, v. 6, n. 6, p. 789-

793, 2011.

LEYVA, M. O. et al. Preventive and post-infection control of *Botrytis cinerea* in tomato plants by hexanoic acid. **Plant pathology**, v. 57, n. 6, p. 1038-1046, 2008.

LIANG, Zhikai; SCHNABLE, James C. Functional divergence between subgenomes and gene pairs after whole genome duplications. *Molecular plant*, v. 11, n. 3, p. 388-397, 2018.

LI, Huiyong et al. Transcriptomic analysis of maize mature embryos from an elite maize hybrid Zhengdan958 and its parental lines. **Plant Growth Regulation**, v. 76, n. 3, p. 315-325, 2015.

LINDERMAYR, Christian. Crosstalk between reactive oxygen species and nitric oxide in plants: key role of S-nitrosogluthathione reductase. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 122, p. 110-115, 2018.

LIU, L.; Hausladen, A.; Zeng, M.; Que, L.; Heitman, J.; Stamler, J.S. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. **Nature** 2001, 410, 490–494.

LLOYD, Andrew et al. Homoeologous exchanges cause extensive dosage-dependent gene expression changes in an allopolyploid crop. **New Phytologist**, v. 217, n. 1, p. 367-377, 2018.

MARINO, Daniel et al. A burst of plant NADPH oxidases. **Trends in plant science**, v. 17, n. 1, p. 9-15, 2012.

MITTLER, Ron. ROS are good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.

PETITOT, Anne-Sophie; LECOULS, Anne-Claire; FERNANDEZ, Diana. Sub-genomic origin and regulation patterns of a duplicated WRKY gene in the allotetraploid species *Coffea arabica*. **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, n. 3, p. 379-390, 2008.

RASUL, Sumaira et al. Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, cell & environment**, v. 35, n. 8, p. 1483-1499, 2012.

SALGADO, Ione et al. Nitric oxide signaling and homeostasis in plants: a focus on nitrate reductase and S-nitrosogluthathione reductase in stress-related responses. **Brazilian Journal of Botany**, v. 36, n. 2, p. 89-98, 2013.

SAKAMOTO, A.; Ueda, M.; Morikawa, H. *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosogluthathione reductase. *FEBS Lett.* 2002, 515, 20–24.

SAVVIDES, Andreas et al. Chemical priming of plants against multiple abiotic stresses: mission possible?. **Trends in plant science**, v. 21, n. 4, p. 329-340, 2016.

STAAB, Claudia A. et al. The Janus face of alcohol dehydrogenase 3. **Chemico-biological interactions**, v. 178, n. 1-3, p. 29-35, 2009.

TORRES, M.A., Jones, J.D. and Dangl, J.L. (2005) Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*.

Nat. Genet. 37(10), 1130– 1134.

VAN BREUSEGEM, Frank; FOYER, Christine; MANN, Giovanni. Reactive oxygen species are crucial “pro-life “survival signals in plants. 2018.

YU, Qingyi et al. Micro-collinearity and genome evolution in the vicinity of an ethylene receptor gene of cultivated diploid and allotetraploid coffee species (*Coffea*). **The Plant Journal**, v. 67, n. 2, p. 305-317, 2011.

CAPÍTULO 2

Análises genômicas e evolutivas de S-nitrosoglutationa redutase (GSNOR) em angiospermas

1. Introdução

O óxido nítrico (NO) é um radical livre sem carga que possui elétrons desemparelhados, permitindo que atue como um sinalizador molecular envolvido em diversos processos biológicos como crescimento radicular, fechamento estomático, germinação e resposta a fatores de estresse biótico ou abiótico (Kovacs et al., 2016; Lindermayr, 2018) ao alterar o estado redox de outras biomoléculas (Frunghillo et al., 2014). A bioprodução de NO se dá por vias enzimáticas e não enzimáticas, como por exemplo, a redução de nitrato no citosol ou a redução de nitrito nas cadeias de transporte de elétrons nas mitocôndrias e cloroplastos (Jahnova et al., 2019). O NO faz parte de uma família de moléculas reativas de nitrogênio (ERNs), o qual inclui também o grupo S-nitrosotiol (SNOs) (Letierrier et al., 2011; Lindermayr, 2018; Jahnova et al., 2019).

Os SNOs são importantes moléculas estáveis que servem como fonte de reserva e transporte de NO em plantas (Jahnova et al., 2019). Eles são formados por S-nitrosilação, que é uma adição seletiva e reversível da porção de óxido nítrico ao átomo de enxofre das cisteínas, que ocorre em tióis e proteínas de baixo peso molecular. A S-nitrosilação é considerada uma importante modificação pós-traducional de proteínas baseada em oxirredução, sendo parte integrante das vias de sinalização de NO e ERNs (Jahnova et al., 2019).

Entre os SNOs, a S-nitrosoglutationa (GSNO), formada pela S-nitrosilação de glutationa, é considerada o SNO mais abundante em plantas, sendo, dessa forma, a principal reserva móvel de NO (Letierrier et al., 2011; Jahnova et al., 2019). A enzima S-nitrosoglutationa redutase (GSNOR) realiza a redução de GSNO, em uma reação dependente de NADH, e é

considerada uma reação chave na mediação dos níveis celulares de GSNO e NO (Lindermayer, 2018). A GSNOR é uma enzima citosólica que, reduzindo GSNO, leva à formação de dissulfeto de glutatona (GSSG) e amônio (Liu et al., 2001). Inicialmente, a enzima foi caracterizada como uma formaldeído desidrogenase dependente de glutatona, que desempenha as mesmas funções enzimáticas da álcool desidrogenase do tipo III (Koivusalo et al., 1989; Sakamoto et al., 2002; Jahnova et al., 2019). No entanto, sabe-se atualmente que o substrato de maior afinidade a esta enzima é a GSNO (Staab et al., 2009; Jahnova et al., 2019). Estudos sugerem a importância da GSNOR em resposta a diversos estresses abióticos (Salgado et al., 2013).

Esta enzima é codificada por um gene de cópia única em diversas plantas angiospermas. No sistema vegetal modelo *Arabidopsis thaliana* corresponde ao gene AT5G43940 denominado genericamente de “Alcohol dehydrogenase” (Kovacs et al., 2016). A GSNOR foi purificada e caracterizada em diversas espécies vegetais, como alface, ervilha, girassol, milho, arroz e arabidopsis (como revisado por Leterrier et al., 2011 e Jahnova et al., 2019). Em tomate, foi observado que a enzima forma uma estrutura homodimérica de 40kDa (Kubienova et al., 2013), e análises estruturais e funcionais indicam que esta estrutura é conservada em angiospermas (Xu et al., 2013). Sua atividade é modulada pela ação dos hormônios vegetais ácido jasmônico e ácido salicílico (Leterrier et al., 2011) e a atividade transcricional do gene varia de acordo com diferentes estresses abióticos.

A enzima GSNOR foi extensivamente estudada do ponto de vista da modelagem da enzima e a importância dos resíduos de cisteína para sua atividade (Xu et al., 2013; Ticha et al., 2017). Entretanto, aspectos evolutivos dos genes que codificam GSNOR ainda são pouco estudados em plantas angiospermas.

2. Objetivos

O objetivo geral foi caracterizar aspectos genômicos, evolutivos e transcricionais da GSNOR em genomas vegetais.

Especificamente pretendeu-se:

- Identificar genes codificantes da enzima GSNOR em genomas de 28 espécies vegetais
- Avaliar o perfil de seleção ocorre entre os genes de GSNOR;
- Verificar se existe padrões distintos de intensidades de seleção positiva nos genes GSNOR em função do grupo vegetal avaliado

3. Materiais e métodos

3.1 Análises evolutivas de GSNOR em angiospermas

3.1.1 Espécies selecionadas para análise

Selecionamos para análise as seguintes espécies angiospermas: *Coffea canephora* (cafeeiro Robusta ou Conilon), *Coffea eugenioides*, *Coffea arabica*, *Arabidopsis thaliana*, *Capsella rubella*, *Citrus sinensis* (laranja), *Prunus persica* (pêssego), *Arachis ipaensis* (amendoim), *Carica papaya* (mamão), *Cucumis sativus* (pepino), *Manihot esculenta* (mandioca), *Populus trichocarpa*, *Solanum lycopersicum* (tomate), *Theobroma cacao* (cacau), *Utricularia gibba*, *Gossypium raimondii* (algodão), *Ricinus communis* (mamona), *Eucalyptus grandis* (eucalipto), *Brachypodium distachyon*, *Sorghum bicolor*, *Oryza sativa* (arroz), *Setaria italica* e a angiosperma basal *Amborella trichopoda*. Também foram selecionadas as seguintes espécies de gimnospermas: *Pinus pinaster* e *Picea glauca* e as espécies fotossintetizantes: *Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffii*, *Chlamydomonas reinhardtii*, como espécies basais. Para *C. eugenioides* e *C. arabica*, os dados foram obtidos do “Arabica Coffee Genome Consortium” (Mueller et al., 2014). Para *Citrus sinensis*, os dados foram obtidos da plataforma PLAZA versão 3.0 (Proost et al., 2015). Os dados genômicos das demais espécies foram obtidos na plataforma PLAZA 4 (Van Bel et al., 2017). Os dados transcricionais de RNA-seq, em Transcritos Por Milhão (TPM) das espécies *Arabidopsis thaliana*, *Brachypodium distachyon*, *Oryza sativa*, *Solanum lycopersicum*, e *Sorghum bicolor* foram obtidos do Gene Expression Atlas (Papatheodorou et al., 2017, <http://www.ebi.ac.uk/gxa/experiments?kingdom=plants>).

3.1.2 Anotação da família gênica GSNOR em genomas vegetais

A sequência proteica de GSNOR de *Arabidopsis thaliana* (gene AT5G43940), que possui o domínio proteico IPR014183 na base de dados Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), foi utilizada como sonda eletrônica (*query*) para procuras por TBLASTN no genoma das espécies selecionadas. A sequência de referência de *Arabidopsis* foi obtida no banco de dados TAIR (www.arabidopsis.org). As regiões de alinhamento com *score* maior que 200 foram analisadas individualmente. As sequências proteicas potencialmente codificadas pelas regiões genômicas selecionadas tiveram seus domínios proteicos identificados pela ferramenta InterPro

(Mitchell et al., 2018). Foram considerados genes codificantes de GSNOR aqueles os quais as proteínas resultantes possuem o domínio InterPro IPR014183 (Alcohol dehydrogenase class III). Suplementarmente, genes que possuíam tamanho de sequência codificante inferior a 90% e superior a 110% ao de *Arabidopsis thaliana* foram reanalisados por ferramentas de inferência de estrutura gênica. Foram utilizadas as ferramentas FGNEISH+ (Solovyev, 2007, disponível em www.softberry.com) e AUGUSTUS (Keller et al., 2011).

O peso molecular (MW) e o ponto isoelétrico das proteínas preditas foram determinados por meio do uso da ferramenta Compute pI/MW (http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool).

As sequências de aminoácidos obtidas foram alinhadas através do programa MUSCLE (Edgar, 2004). A árvore filogenética foi gerada no software MEGA X (Kumar et al., 2018) utilizando-se a metodologia de máxima verossimilhança, bootstrap de 1000 réplicas, deleção parcial de gaps (*pairwise*) e o modelo de substituição K2+G+I, determinado de acordo com o teste realizado no *software*.

As taxas de substituição sinônimas (dS) e não-sinônimas (dN) nas sequências codificantes também foram avaliadas, utilizando estratégias similares a anotação de famílias gênicas em banana (Jourda et al. 2014) e em *Populus* (Tian et al., 2015).

Para avaliar a pressão seletiva que atua nessas sequências foi calculada a razão dN/dS, onde $dN/dS = 1$, $dN/dS < 1$ e $dN/dS > 1$ representam evolução neutra, seleção purificadora e seleção positiva Darwiniana, respectivamente. Para identificar resíduos de proteínas GSNOR selecionados evolutivamente entre os grupos vegetais analisados, foram utilizadas duas estratégias. Primeiramente, foi utilizado o Selecton Server (<http://selecton.tau.ac.il/>) (Stern et al., 2007) para cálculo da seleção específica de resíduos em proteínas GSNOR. Este servidor implementa vários modelos evolutivos que descrevem em termos probabilísticos como os aminoácidos individualmente evoluem. Esses modelos utilizam diferentes pressupostos biológicos para testar os dados e assumir uma distribuição estatística distinta para valores de dN / dS heterogêneos entre as regiões da proteína avaliada. Neste estudo, foram utilizados os modelos evolutivos M5 (distribuição gama de dN/dS), M7 (distribuição beta de dN/dS), M8a (ds=1) e M8a (ds>=1). Para avaliar e confirmar estes dados, foram ainda obtidos dados de seleção resíduo-específica também utilizando métodos baseados em análise por máxima verossimilhança de códon pelo servidor Datamonkey 2.0 (<https://www.datamonkey.org/>) (Weaver et al., 2018). Nele foram testados os modelos evolutivos “fixed effects likelihood” (FEL) e “Single-Likelihood Ancestor Counting” (SLAC) (Kosakovsky et al., 2005) nas opções padrão do servidor.

Para predição da estrutura 3D de proteínas GSNOR de espécies de *Coffea* foi usada a ferramenta Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) (Kelley et al., 2005).

4. Resultados e Discussão

4.1 Análises evolutivas de GSNOR

O gene codificante em *A. thaliana* (AT5G43940) foi o ponto de partida para identificação de GSNOR em espécies vegetais utilizado como *query* para procuras por TBLASTN. Com essa análise foram obtidas 34 sequências em 27 espécies. Nas espécies vegetais superiores *A. ipaensis*, *C. arabica*, *G. raimondii*, *M. esculenta* e *P. pinaster* foram identificados dois genes. Também foi identificado dois genes na alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* e no musgo *Physcomitrella patens*. As demais espécies possuem uma cópia única do gene GSNOR (Tabela 1).

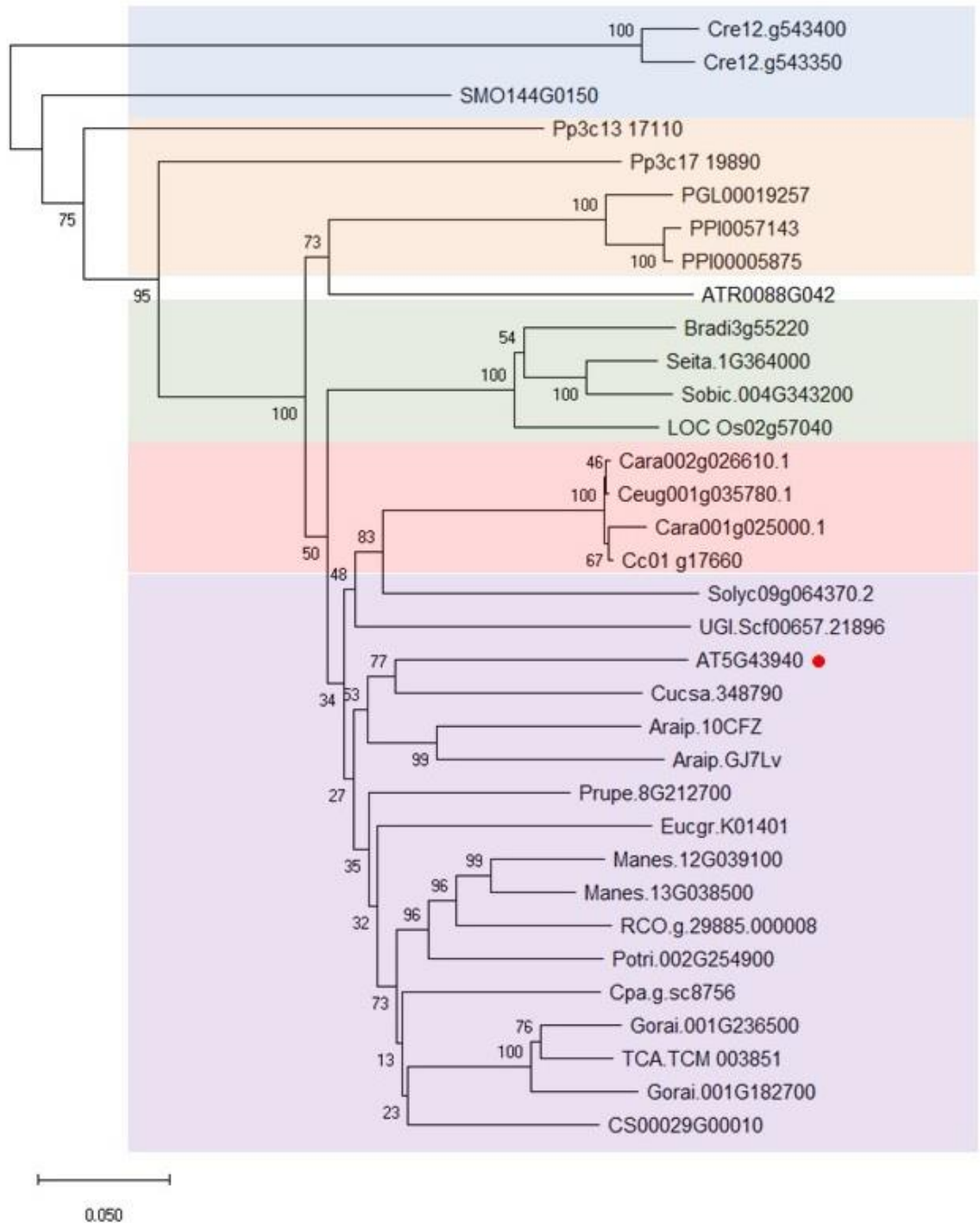
Tabela 1: **Características gerais dos genes GSNOR.** Legenda: gene ID – identificação do gene na base de dados; CDS – tamanho em nucleotídeos do quadro aberto de leitura; Proteína – tamanho em aminoácidos da proteína obtida; PI – ponto isoelétrico; MW – massa molecular; Chr – cromossomo onde se localiza o gene.

Espécie	Gene ID	CDS	A.A	P.I.	M.W.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT5G43940	1176	391	6.91	42.05
<i>Arachis ipaensis</i>	Araip.10CFZ	1140	379	6.91	40.38
	Araip.GJ7Lv	1140	379	7.29	40.46
<i>Carica papaya</i>	Cpa.g.sc87.56		379	7.09	40.76
<i>Citrus sinensis</i>	CS00029G000	1140	379	7.09	40.78
<i>Coffea arabica</i>	Cara002g026610	1143	375	6.5	40.32
	Cara001g025000	1143	375	6.7	40.38

<i>Coffea canephora</i>	Cc01_g17660	1140	379	6.91	40.74
<i>Coffea eugenioides</i>	Ceug001g035780	1140	379	6.92	40.77
<i>Cucumis sativus</i>	Cucsa.348790	1140	378	7.12	40.59
<i>Eucalyptus grandis</i>	Eucgr.K01401	1140	379	6.64	40.44
<i>Gossypium raimondii</i>	Gorai.001G236500	1140	379	7.04	40.71
	Gorai.001G182700	1074	357	6.95	38.52
<i>Manihot esculenta</i>	Manes.12G039100	1140	379	7.12	40.78
	Manes.13G038500	1140	385	7.29	40.64
<i>Picea glauca</i>	PGL00019257	1155	384	7.13	41.25
<i>Pinus pinaster</i>	PpI00057143	1171	389	7.13	41.16
	PpI00005875	1155	384	7.13	41.35
<i>Populus trichocarpa</i>	Potri.002G254900	1140	379	6.91	40.75
<i>Prunus persica</i>	Prupe.8G212700	1140	379	7.09	40.45
<i>Ricinus communis</i>	RCO.g.29885.000008	1140	379	6.79	40.75

<i>Solanum lycopersicum</i>	Solyc09g064370.2	1149	382	7.96	41.29
<i>Theobroma cacao</i>	TCA.TCM_003851	1140	379	6.91	
<i>Utricularia gibba</i>	UGI.scf00657.21896	1140	379	6.74	40.51
<i>Amborella trichopoda</i>	ATR0088G042	1140	379	6.91	40.84
<i>Brachypodium distachyon</i>	Bradi3g55220	1146	381	6.95	40.72
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cre12.g543400	1137	378	6.73	40.41
	Cre12.g543350	1134	377	6.95	40.41
<i>Oryza sativa</i>	LOC_Os02g57040	1146	381	7.12	40.83
<i>Physcomitrella patens</i>	Pp3c17_19890	1143	380	7.03	40.62
	Pp3C13_17110	1299	432	6.50	42.22
<i>Selaginella moellendorffii</i>	SMO144G0150	1143	380	7.16	40.53
<i>Setaria italica</i>	Seita.1G364000	1146	381	7.03	40.74
<i>Sorghum bicolor</i>	Sobic.004G343200	1146	381	6.84	40.76

Figura 2: **Ánálise filogenética de máxima verossimilhança com aminoácidos de GSNOR em 27 espécies vegetais.** Os valores representados nos clados indicam a porcentagem do *bootstrap* obtido. Legenda: Azul: espécies basais. Laranja: Gimnospermas. Verde: Monocotiledôneas. Vermelho: gênero *Coffea*. Roxo: Eudicotiledôneas. Ponto vermelho: *A. thaliana*



Todos os genes GSNOR de plantas angiospermas (eudicotiledôneas e monocotiledôneas) agruparam-se em um único clado de acordo com o grupo vegetal amostrado

em alto suporte de *bootstrap* (Figura 2). Genes GSNOR de gimnospermas, licófitas e clorófitas ficaram externos aos clados de angiospermas, indicando que não há evidências de transferência horizontal de genes. A angiosperma basal *A. trichopoda* possui um único gene GSNOR, sugerindo que houve alguma perda de genes anterior a diversificação de angiospermas e que as duplicações observadas em eudicotiledôneas e monocotiledôneas são eventos genômicos espécie-específicos.

A fim de identificar padrões de seleção em GSNOR, analisamos os perfis de substituições sinônimas e não-sinônimas dividindo as sequências nos seguintes grupos: eudicotiledôneas, monocotiledôneas, gênero *Coffea*, espécies basais e gimnospermas. Em todos os grupos analisados, a pressão seletiva predominante foi do tipo purificadora. O grupo com espécies do gênero *Coffea* foi o que apresentou maior razão de seleção, devido às baixas taxas tanto de substituições sinônimas como não-sinônimas (Tabela 2). Nas espécies basais, houve um grande predomínio de substituições sinônimas, mas ainda assim, apresentaram a segunda maior razão de seleção. Eudicotiledôneas apresentam maior intensidade de seleção purificadora quando comparadas a monocotiledôneas.

Não encontramos sobreposição de sítios específicos que sofrem seleção positiva entre as abordagens avaliadas (Tabelas 3 e 4). Encontramos um sítio de seleção positiva em monocotiledôneas e quatro sítios de seleção positiva no gênero *Coffea* unicamente pelo modelo FEL (Tabela 4), Um total de nove sítios de seleção positiva foram identificados em *Coffea* pelo uso dos modelos M5 e M8 ($ds \geq 1$) com o *software* Selecton (Tabela 3)

Tabela 2: Taxas de substituição sinônimas (dS) e não-sinônimas (dN) para amino ácidos de GSNOR.

Grupo	dS	dN	dN/dS
Todas espécies	1.21±0.0 6	0.07±0.0 1	0.05
Eudicotiledôneas	1.22±0.0 7	0.05±0.0 1	0.04
Monocotiledôneas	0.39±0.0 3	0.04±0.0 1	0.10
Gênero <i>Coffea</i>	0.02±0.0	0.01±0.0	0.5

Gimnospermas	1	0	0.06
	0.15±0.0	0.01±0.0	
Basais	2	0	0.12
	1.70±0.3	0.21±0.0	
	3	2	

Tabela 3: **Sítios de seleção positiva com base nas análises do programa Selecton.**
Modelos evolutivos M5 (gama), M7 (beta), M8 a ($ws \geq 1$) e M8a ($ws=1$).

Modelo	Grupo	dN/dS	Log-likelihood	Sítios de seleção positiva
M5 (gama)	Eudicotiledôneas	0.04	-3603.72	24, 214, 228, 229, 232, 233, 234, 235,293
	Monocotiledôneas	0.10	-2526.06	
	<i>Coffea</i>	0.5	-1691.09	
	Gimnospermas	0.06	-1830.95	
	Basais	0.12	-4275.39	
M7 (beta)	Eudicotiledôneas	0.04		
	Monocotiledôneas	0.10	-2526.48	
	<i>Coffea</i>	0.5	-1694.56	
	Gimnospermas	0.06	-1831	
	Basais	0.12	-4274.12	
M8a ($ws \geq 1$)	Eudicotiledôneas	0.04	-8600.41	
	Monocotiledôneas	0.10	-2526.06	

	Coffea	0.5	-1687.92	24, 214, 228, 229, 232, 233, 234, 235, 293
	Gimnospermas	0.06	-1830.86	
	Basais	0.12	-4274.41	
M8a (ws=1)	Eudicotiledôneas	0.04	-8599.96	
	Monocotiledôneas	0.10	-2526.07	
	Coffea	0.5	-1693.54	
	Gimnospermas	0.06	-1830.85	
	Basais	0.12	-4274.48	

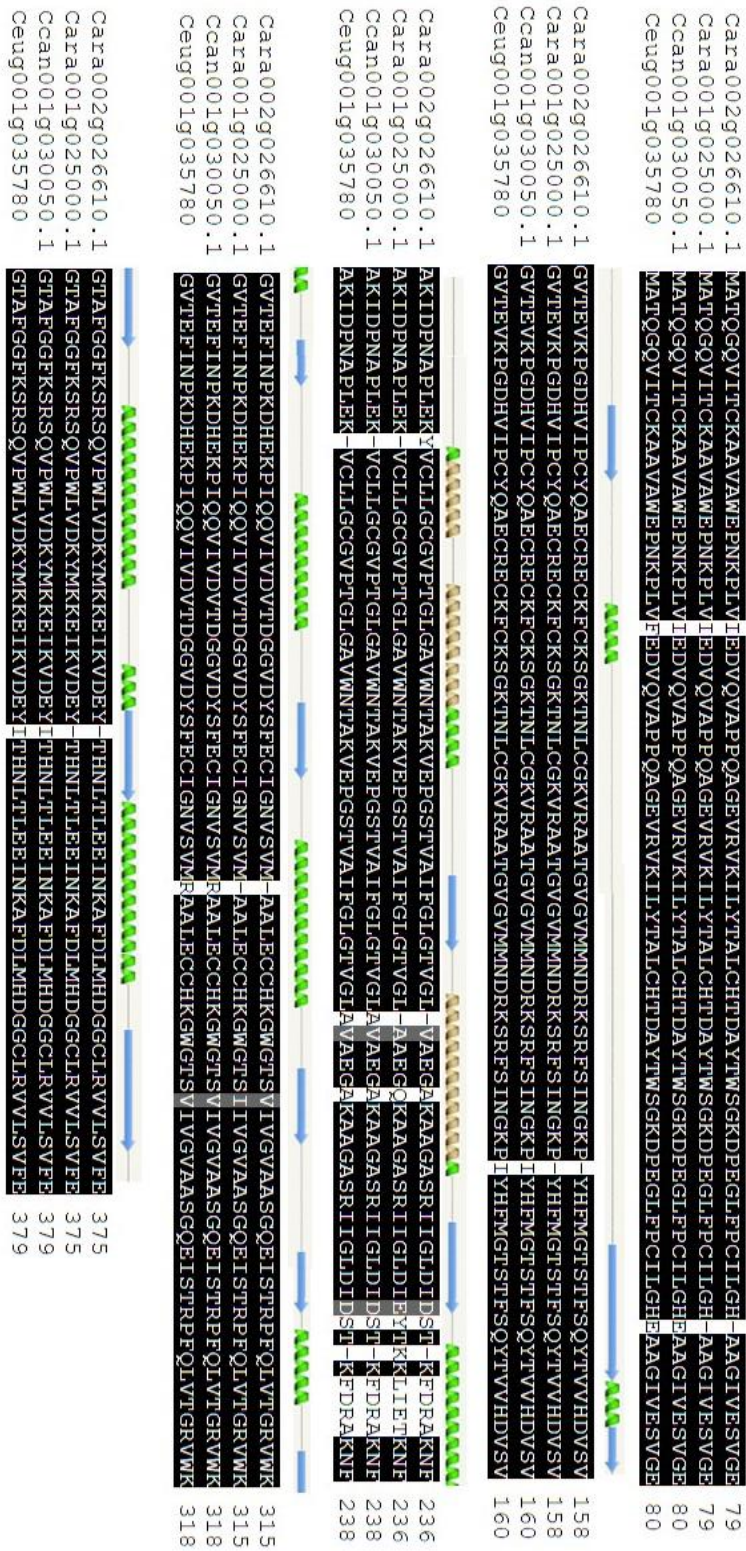
Tabela 4: **Taxa de substituição sinônimas (dS) e não-sinônimas (dN), e análises de sítios de seleção positiva.** Modelos evolutivos FEL e SLAC.

Grupo	dN/dS	Sítios com seleção positiva		Análise integrativa
		FEL	SLAC	
Eudicotiledôneas	0.04	-	-	
Monocotiledôneas	0.10	413	-	1
Gênero <i>Coffea</i>	0.5	247, 267, 268	-	3
Gimnospermas	0.06	-	-	
Basais	0.12	-	-	

O gênero *Coffea* possui proteínas altamente conservadas, garantindo uma conformação muito similar das GSNOR modeladas para *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides* (Figura 3)

Figura 3: **Distribuição de sítios de aminoácidos conservados para o gênero *Coffea* e**

conformação secundária de proteína. Setas azuis representam conformação beta e as espirais verdes representam a conformação alfa-hélice



Foram obtidos dados de RNA-seq para GSNOR em cinco espécies vegetais: duas

eudicotiledôneas e três monocotiledôneas. Nas duas espécies eudicotiledôneas analisadas (Figura 4 e Figura 5), os órgãos com maior intensidade de expressão de GSNOR foram flores e raízes. Já nas espécies monocotiledôneas, há a prevalência de expressão em flores e embrião (Figuras 6, 7 e 8).

Figura 4: Taxas de expressão em TPM do gene AT5G43940 em flor, fruto, folha e raiz.

Arabidopsis thaliana

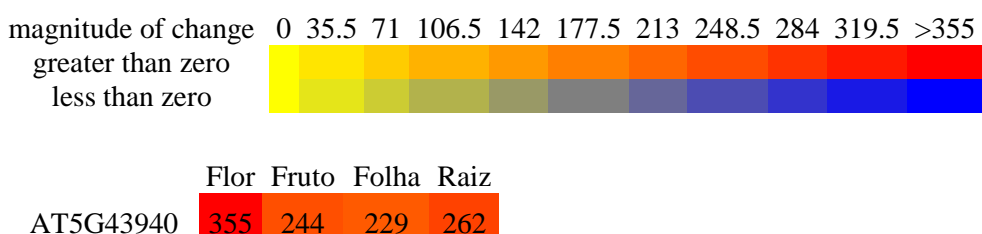


Figura 5: Taxas de expressão em TPM do gene Solyc09g064370 em flor, folha e raiz

Solanum lycopersico

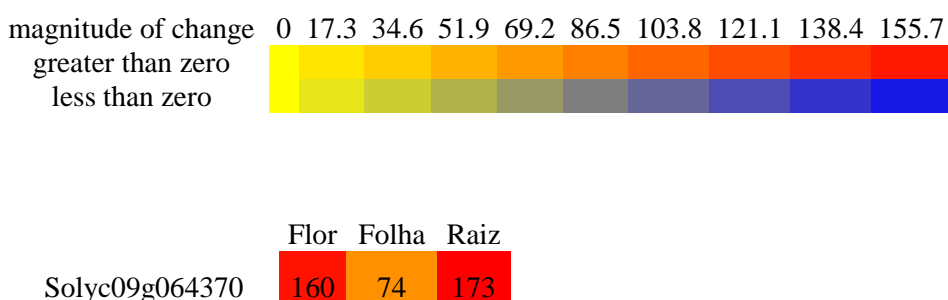


Figura 6: Taxas de expressão em TPM do gene LOC_Os02g57040 em inflorescência, endosperma, folha, embrião e semente.

Oryza sativa

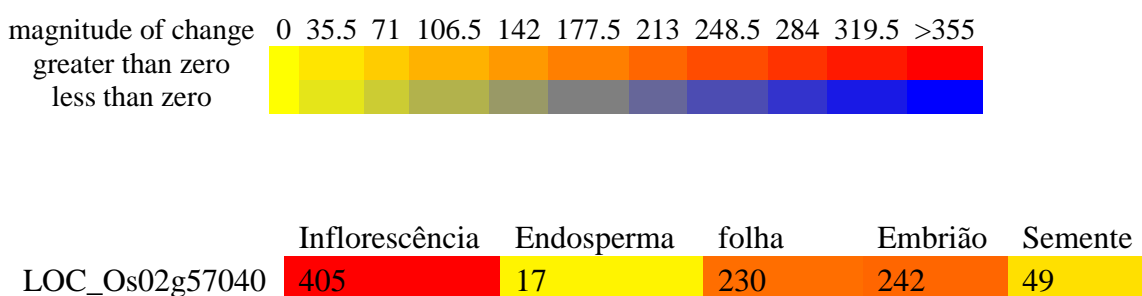


Figura 7: Taxas de expressão em TPM do gene Bradi3g55220 em inflorescência, endosperma, folha, embrião e semente.

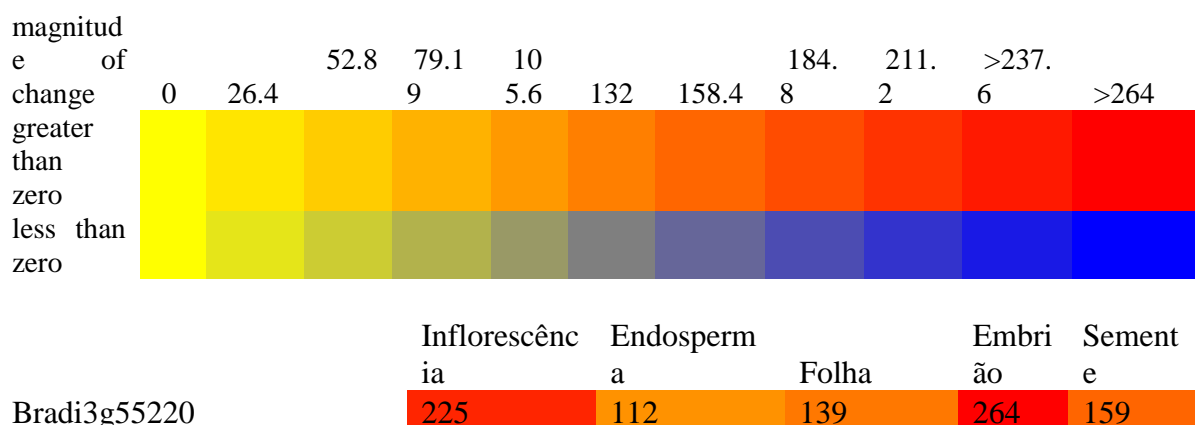
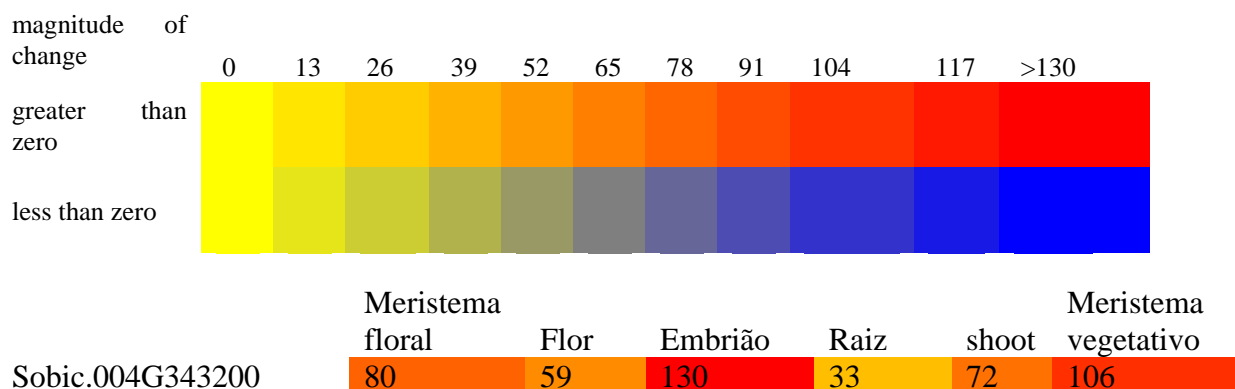
Brachypodium distachyon

Figura 8: Taxas de expressão em TPM do gene *Sobic.004G343200* em meristema floral, flor, embrião, raiz, shoot (parte aérea) e meristema vegetativo.

Sorghum bicolor

5. Conclusão

Ao longo da evolução de plantas superiores, os dados sugerem que houve uma perda de genes GSNOR, já que em espécies basais encontramos famílias gênicas com 2 genes para GSNOR, enquanto que na maioria das espécies eudicotiledôneas e monocotiledôneas encontramos apenas 1 gene, com exceção às espécies poliploides e de duplicação espécie-específica. A seleção purificadora de GSNOR é mais intensa em eudicotiledôneas que em monocotiledôneas, sugerindo padrões distintos de seleção de GSNOR entre angiospermas. Em termos de expressão, há um claro padrão preferencial de expressão de GSNOR em tecidos florais; no entanto, em espécies eudicotiledôneas GSNOR também é altamente expressa em raízes, enquanto em monocotiledôneas há uma tendência para expressão em embrião. Nesse sentido,

futuros estudos podem melhor identificar padrões gerais de atividade transcricional de GSNOR em angiospermas e padrões mais específicos em eudicotiledôneas e monocotiledôneas.

Referências

EDGAR, Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acid research*, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

FRUNGILLO, Lucas et al. S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. **Nature Communications**, v. 5, p. 5401, 2014.

JAHNOVÁ, Jana; LUHOVÁ, Lenka; PETŘIVALSKÝ, Marek. S-Nitrosogluthione Reductase—The Master Regulator of Protein S-Nitrosation in Plant NO Signaling. *Plants*, v. 8, n. 2, p. 48, 2019.

JOURDA, Cyril et al, Expansion of banana (*Musa acuminata*) gene families involved in ethylene biosynthesis and signalling after lineage-specific whole-genome duplications, *New Phytologist*, v. 202, n. 3, p. 986-1000, 2014

KELLER, Oliver et al. A novel hybrid gene prediction method employing protein multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, v. 27, n. 6, p. 757-763, 2011.

KOIVUSALO, M.; Baumann, M.; Uotila, L. Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett.* 1989, 257, 105–109.

KORNOBIS, Etienne et al. TRUFA: a user-friendly web server for de novo RNA-seq analysis using cluster computing. *Evolutionary bioinformatics online*, v. 11, p. 97, 2015.

KOVACS, Izabella et al. ROS-Mediated Inhibition of S-nitroso glutathione Reductase Contributes to the Activation of Anti-oxidative Mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

KUBIENOVÁ, L.; Kopečný, D.; Tylichová, M.; Briozzo, P.; Skopalová, J.; Šebela, M.; Navrátil, M.; Tâche, R.; Luhová, L.; Barroso, J.B.; et al. Structural and functional characterization of a plant S-nitrosogluthione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie* 2013, 95, 889–902.

KUMAR, Sudhir et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.

LETERRIER, Marina et al. Function of S-nitroso glutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 6, p. 789-793, 2011.

LINDERMAYR, Christian. Crosstalk between reactive oxygen species and nitric oxide in

plants: key role of S-nitrosogluthathione reductase. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 122, p. 110-115, 2018.

LIU, L.; Hausladen, A.; Zeng, M.; Que, L.; Heitman, J.; Stamler, J.S. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* 2001, 410, 490–494.

MAJOROS, William H.; PERTEA, Mihaela; SALZBERG, Steven L. TigrScan and GlimmerHMM: two open source ab initio eukaryotic gene-finders. *Bioinformatics*, v. 20, n. 16, p. 2878-2879, 2004.

MILLER, Gad et al. The plant NADPH oxidase RbohD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci. Signal.*, v. 2, n. 84, p. ra45-ra45, 2009

MITTLER, Ron. ROS are good. *Trends in Plant Science*, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.

PAPATHEODOROU, Irene et al. Expression Atlas: gene and protein expression across multiple studies and organisms. *Nucleic acids research*, v. 46, n. D1, p. D246-D251, 2017.

PROOST, S. et al. PLAZA 3.0: an access point for plant comparative genomics. *Nucleic acids research*, v. 43 (D1), p. D974-D981, 2015

SAKAMOTO, A.; Ueda, M.; Morikawa, H. Arabidopsis glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosogluthathione reductase. *FEBS Lett.* 2002, 515, 20–24.

SALGADO, Ione et al. Nitric oxide signaling and homeostasis in plants: a focus on nitrate reductase and S-nitrosogluthathione reductase in stress-related responses. *Brazilian Journal of Botany*, v. 36, n. 2, p. 89-98, 2013

SOLOVYEV, V.; DIRECTOR OF BIOINFORMATICS. Statistical approaches in eukaryotic gene prediction. *Handbook of statistical genetics*, 2004.

STAAB, Claudia A. et al. The Janus face of alcohol dehydrogenase 3. *Chemico-biological interactions*, v. 178, n. 1-3, p. 29-35, 2009.

TIAN, Fengxia et al. Genome-wide identification, classification, and expression analysis of 14-3-3 gene family in *Populus*. *PloSone*, v. 10, n. 4, p. e0123225, 2015.

TICHÁ, Tereza et al. Redox regulation of plant S-nitrosogluthathione reductase activity through post-translational modifications of cysteine residues. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 494, n. 1-2, p. 27-33, 2017.

VAN BEL, Michiel et al. PLAZA 4.0: an integrative resource for functional, evolutionary and comparative plant genomics. *Nucleic acids research*, v. 46, n. D1, p. D1190-D1196, 2017.

VAN BREUSEGEM, Frank; FOYER, Christine; MANN, Giovanni. Reactive oxygen species are crucial “pro-life “survival signals in plants. 2018.

XIA, Xuhua. DAMBE6: New Tools for Microbial Genomics, Phylogenetics, and Molecular Evolution. *Journal of Heredity*, v. 108, n. 4, p. 431-437, 2017.

XU, Shengbao et al. S-nitrosogluthione reductases are low-copy number, cysteine-rich proteins in plants that control multiple developmental and defense responses in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 430, 2013.

CAPÍTULO 3

Análises genômicas e evolutivas de nadph oxidase (Rboh) em angiospermas

1. Introdução

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas instáveis e altamente reativas, formadas pela redução incompleta de O_2 em H_2O , com capacidade de transformar outras moléculas com as quais colidem. Elas contêm radicais superóxidos (O_2^-), que em níveis atenuados podem atuar como sinalizadores moleculares em diversas situações fisiológicas (Mittler, 2017). Entretanto, a geração excessiva de EROs pode causar danos a proteínas, clorofila, DNA, vazamento iônico e pode levar a morte celular (Del Castello et al., 2019). A produção e degradação de EROs pode ocorrer na membrana plasmática, mitocôndria, cloroplasto, retículo endoplasmático e peroxissomas (Van Breusegem et al, 2018; Czarnocka e Karpinski, 2018).

Em plantas, a principal fonte de EROs é proveniente da oxidação de NADPH catalisada por O_2^- (Marino et al., 2013; Cheng et al., 2013). O NADPH funciona como um doador de elétrons citosólico ao reduzir o O_2 extracelular. NADPH oxidases são proteínas membranares, que por meio da fosforilação de seu domínio N-terminal doam um elétron para O_2 , gerando assim o superóxido (O_2^-). NADPH oxidases são codificadas por uma família gênica denominada, em inglês, “*Respiratory burst oxidase homologs*” (Rboh) (Marino et al., 2012; Cheng et al., 2013). Em *Arabidopsis thaliana* ocorrem 10 genes na família gênica Rboh (RbohA-RbohJ). Estudos do perfil transcricional da família gênica Rboh em *Arabidopsis thaliana* indicam que RbohC, RbohD e RbohF estão relacionadas a desenvolvimento e alongamento de raiz, formação de raízes laterais. RbohD e RbohF também estão relacionadas ao fechamento estomático. RbohB atua durante o amadurecimento de sementes. RbohH e RbohJ estão relacionadas ao crescimento do tubo polínico. RbohE atua no desenvolvimento da antera e pólen (Chapman et al., 2019).

Em plantas, diversas análises tiveram como objetivo compreender padrões filogenéticos espécie-específicos da família gênica Rboh (Lightfoot et al., 2008; Cheng et al., 2013; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2018; Li et al., 2019). No entanto, estudos comparativos que

compreendam padrões evolutivos de Rboh em angiospermas ainda são pouco explorados.

2. Objetivos

O objetivo geral foi caracterizar aspectos genômicos, evolutivos e transcricionais da família gênica Rboh em genomas vegetais

Especificamente pretendeu-se:

- Identificar genes codificantes da enzima Rboh em genomas de 27 espécies vegetais
- Avaliar o perfil de seleção que ocorre entre os genes codificantes de Rboh;
- Verificar se existe padrões distintos de intensidades de seleção positiva nos genes Rboh em função do grupo vegetal avaliado

3. Materiais e métodos

3.1 Análises evolutivas de Rboh em angiospermas

3.2.1 - Espécies selecionadas para análise

Selecionamos para análise as seguintes espécies angiospermas: *Coffea canephora* (cafeeiro Robusta ou Conilon), *Coffea eugenioides*, *Coffea arabica*, *Arabidopsis thaliana*, *Capsella rubella*, *Citrus sinensis* (laranja), *Prunus persica* (pêssego), *Arachis ipaensis* (amendoim), *Carica papaya* (mamão), *Cucumis sativus* (pepino), *Manihot esculenta* (mandioca), *Populus trichocarpa*, *Solanum lycopersicum* (tomate), *Theobroma cacao* (cacau), *Utricularia gibba*, *Gossypium raimondii* (algodão), *Ricinus communis* (mamona), *Eucalyptus grandis* (eucalipto), *Brachypodium distachyon*, *Sorghum bicolor*, *Oryza sativa* (arroz), *Setaria italica* e a angiosperma basal *Amborella trichopoda*. Também foram selecionadas as seguintes espécies de gimnospermas: *Pinus pinaster* e *Picea glauca* e as espécies fotossintetizantes basais *Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffii*, *Chlamydomonas reinhardtii*. Para *C. eugenioides* e *C. arabica*, os dados foram obtidos do “Arabica Coffee Genome Consortium” (Mueller et al., 2014). Para *Citrus sinensis*, os dados foram obtidos da plataforma PLAZA versão 3.0 (Proost et al., 2015). Os dados genômicos das demais espécies foram obtidos na plataforma PLAZA 4 (Van Bel et al., 2017). Os dados transcricionais de RNA-seq, em Transcritos Por Milhão (TPM) das espécies *Arabidopsis thaliana*, *Brachypodium distachyon*, *Oryza sativa*, *Solanum lycopersicon*, e *Sorghum bicolor* foram obtidos do Gene Expression

Atlas (Papatheodorou et al., 2017, <http://www.ebi.ac.uk/gxa/experiments?kingdom=plants>), unificados para o domínio InterPro IPR013623.

1.2.2 - Anotação da família gênica Rboh em genomas vegetais

As sequências proteicas dos genes codificantes de Rboh de *Arabidopsis thaliana* (genes AT1G64060, AT5G47910, AT5G51060, AT1G09090, AT4G11230, AT4G11230, AT1G19230, AT5G07390, AT5G60010 e AT4G25090), foram utilizadas como sonda eletrônica (*query*) para procuras por TBLASTN no genoma das espécies selecionadas. A sequência de referência de *Arabidopsis* foi obtida no banco de dados TAIR (www.arabidopsis.org). As regiões de alinhamento com *score* maior que 200 foram analisadas individualmente. As sequências proteicas potencialmente codificadas por estas regiões genômicas selecionadas tiveram seus domínios proteicos identificados pela ferramenta InterPro (Mitchell et al., 2018). Foram considerados genes codificantes de Rboh aqueles os quais as proteínas resultantes possuem os domínios IPR013130 (*Ferric reductase transmembrane component-like domain*), IPR013121 (*Ferric reductase, NAD binding domain*) e IPR013623 (*NADPH oxidase Respiratory burst*) na base de dados interprot (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>). Suplementarmente, genes que possuíam tamanho de sequência codificante inferior a 90% e superior a 110% ao de *Arabidopsis thaliana* foram re-analisados por ferramentas de inferência de éxon/íntrons, FGNEISH+ (Solovyev, 2007, disponível em www.softberry.com) e AUGUSTUS (Keller et al., 2011).

O peso molecular (MW) e o ponto isoelétrico das proteínas preditas foram determinados por meio do uso da ferramenta Compute pI/MW (http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool).

As sequências de aminoácidos obtidas foram alinhadas através do programa MUSCLE (Edgar, 2004). A árvore filogenética foi gerada no software MEGA X (Kumar et al., 2018) utilizando-se a metodologia de máxima verossimilhança, bootstrap de 1000 réplicas, deleção parcial de gaps (*pairwise*) e o modelo de substituição JTT+G+I, determinado de acordo com o teste realizado no *software*.

As taxas de substituição sinônimas (dS) e não-sinônimas (dN) nas sequências codificantes também foram avaliadas, utilizando estratégias similares a anotação de famílias gênicas em banana (Jourda et al. 2014) e em *Populus* (Tian et al., 2015).

Para avaliar a pressão seletiva que atua nessas sequências será calculada a razão dN/dS, onde $dN/dS = 1$, $dN/dS < 1$ e $dN/dS > 1$ representam evolução neutra, seleção purificadora e

seleção positiva Darwiniana, respectivamente. Para identificar resíduos de proteínas Rboh selecionados evolutivamente, foi usado o Selecton Server (<http://selecton.tau.ac.il/>) (Stern et al., 2007) para cálculo da seleção específica de resíduos em proteínas Rboh. Este servidor implementa vários modelos evolutivos que descrevem em termos probabilísticos como os aminoácidos individualmente evoluem. Esses modelos utilizam diferentes pressupostos biológicos para testar os dados e assumir uma distribuição estatística distinta para valores de dN / dS heterogêneos entre as regiões da proteína avaliada. Neste estudo, foram utilizados os modelos evolutivos M5 (distribuição gama de dN/dS), M7 (distribuição beta de dN/dS), M8a (ds=1) e M8a (ds>=1). Para avaliar e confirmar estes dados, foram ainda obtidos dados de seleção resíduo-específica também utilizando métodos baseados em análise por máxima verossimilhança de códon pelo servidor Datamonkey 2.0 (<https://www.datamonkey.org/>) (Weaver et al., 2018). Nele foram testados os modelos evolutivos “fixed effects likelihood” (FEL) e “Single-Likelihood Ancestor Counting” (SLAC) (Kosakovsky et al., 2005) nas opções padrão do servidor.

4. Resultados e Discussão

Os 10 genes de *A. thaliana* (AT1G64060, AT5G47910, AT5G51060, AT1G09090, AT4G11230, AT4G11230, AT1G19230, AT5G07390, AT5G60010 e AT4G25090), que contém os domínios protéicos IPR013130, IPR013121 e IPR013623 da base Interpro foram utilizados como *query* para procuras por TBLASTN. Com essa análise foram obtidas 172 sequências em 27 espécies (Tabela 5). Entre as angiospermas (eudicotiledôneas/monocotiledôneas), a espécie com maior número de genes codificantes de Rboh foi *Gossypium raimondii*, com treze genes e a espécie com menor número de genes foi *Utricularia gibba*, com apenas um gene (Tabela 5).

Tabela 5: **Características gerais dos genes de Rboh.** Legenda: gene ID – identificação do gene na base de dados; CDS – tamanho em nucleotídeos do quadro aberto de leitura; Proteína – tamanho em aminoácidos da proteína obtida; Hom - homólogo; M. W - peso molecular; P.I - ponto isoelétrico.

Espécie	Gene ID	CDS	Proteína	Hom	M.W (kDa)	P.I (pH)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT1G64060	2835	945	F	108.43	9.54

	AT5G47910	2766	922	D	103.92	9.68
	AT5G51060	2718	906	C	102.53	9.91
	AT1G09090	2532	844	B	96.40	9.59
	AT3G45810	2826	942	J	102.95	9.90
	AT4G11230	2739	913	I	106.97	8.58
	AT1G19230	2808	935	E	105.56	9.04
	AT5G07390	2709	903	A	102.95	9.54
	AT5G60010	2661	887	H	100.64	9.56
	AT4G25090	2550	850	G	96.87	9.41
<i>Arachis ipaensis</i>	Araip.GM90H	2952	983	F	111.48	9.61
	Araip.JFL5M	2571	857	B	97.11	9.33
	Araip.RT5CP	2658	885	D	100.32	9.31
	Araip.NJG8K	2850	949	E	107.58	9.10
	Araip.3V48G	2040	679	D	78.23	9.89
	Araip.C219V	2577	858	J/H	97.67	9.17
	Araip.HQ9VR	2781	926	F	105.44	9.63
	Araip.URB55	2360	819	B	93.43	9.73
<i>Carica papaya</i>	Cpa.g.sc2279.1	2460	820	F	94.01	7.16
	Cpa.g.sc139.10	2550	849	J/H	97.40	9.67
	Cpa.g.sc48.86	2712	903	B	102.21	9.44
	Cpa.g.sc82.74	2535	844	E	95.63	8.76
	Cpa.g.sc3853	2760	919	D	103.76	9.63
	Cpa.g.sc13.202	2760	919	D	103.23	9.54
	Cpa.g.sc201.1	2856	951	F	108.21	9.72

<i>Citrus sinensis</i>	Cs0087G00240	2436	812	D	91.66	9.26
	CS00401G00020	2937	913	D	103.15	9.33
	CS00103G00200	2670	890	B	101.03	9.45
	CS00013G01980	2628	876	E	99.50	9.57
	CS0009G01550	2841	947	F	107.49	9.75
	CS00014G01290	2535	845	J/H	96.92	9.11
<i>Coffea arabica</i>	Cara008g010360	2802	920	D	99.01	9.84
	Cara003g043510	2640	867	B	99.08	9.70
	Cara004g044160	2640	867	B	102.93	9.82
	Cara007g010560	2802	920	D	103.18	9.82
	Cara016g023380	2715	892	F	92.04	9.91
	Cara015g023320	2187	718	F	83.14	9.65
	Cara011g017040	2760	906	E	89.70	9.32
	Cara012g017110	2817	925	E	104.51	9.55
	Cara001g019390	2512	826	J/H	94.35	8.90
	Cara002g021790	2517	827	J/H	94.13	8.90
<i>Coffea canephora</i>	Cc08_g15360	2874	957	F	108.93	9.57
	Cc02_g33130	2640	879	B	100.35	9.70
	Cc01_g011980	2433	810	J/H	92.49	9.29
	Cc04_g05580	2802	933	C	104.31	9.71
	Cc06_g12630	2775	924	E	104.40	9.60
<i>Coffea eugenioides</i>	Ceug002g050470	2619	852	B	99.41	9.59

	Ceug004g010790	2808	935	D	104.80	9.78
	Ceug008g030390	2889	962	F	109.41	9.57
	Ceug006g018790	2817	938	E	105.85	9.45
	Ceug001g029980	2670	889	J/H	101.70	8.96
<i>Cucumis sativus</i>	Cucsa_198230	2400	799	F	92.64	9.09
	Cucsa.107010	2766	921	I	105.33	9.12
	Cucsa.181960	2670	889	B	101.11	9.61
	Cucsa.303570	2934	977	F	111.61	9.25
	Cucsa.379670	2499	832	J/H	95.82	8.36
	Cucsa.011690	2730	909	E	103.87	8.97
	Cucsa.340760	2781	935	D	104.34	9.57
<i>Eucalyptus grandis</i>	Eucgr,C00773	2778	925	E	104.76	8.50
	Eucgr,J02107	2574	857	J/H	98.47	9.78
	Eucgr.J01662	2904	967	D	108.04	9.56
	Eucgr.L01771	2670	889	B	101.22	9.22
	Eucgr.F02491	2397	798	J/H	91.89	9.95
	Eucgr.E00785	2898	965	F	108.97	9.45
<i>Gossypium raimondii</i>	Gorai.001G053300	2724	907	D	102.76	9.25
	Gorai.001G017400	2832	943	E	106.99	8.88
	Gorai.008G212100	2763	920	D	89.02	9.08
	Gorai.003G117900	2760	919	E	100.87	9.52
	Gorai.002G128200	2361	786	D	105.79	9.76
	Gorai.007G299500	2655	884	B	105.08	9.70

	Gorai.008G250500	2787	928	F	105.89	9.67
	Gorai.004G137300	2766	921	F		
	Gorai.003G085100	2790	929	F		
	Gorai.009G273400	2793	930	D	104.68	9.43
	Gorai,001G106500	2526	841	J/H	95.97	9.33
	Gorai.008G199100	2409	802	D	90.67	9.22
	Gorai.0096203500	2811	936	D	105.42	9.30
<i>Manihot esculenta</i>	Manes.04G02800	2652	899	J/H	100.63	9.62
	Manes.08G118500	2655	884	B	100.55	9.55
	Manes.08G057200	2274	757	F	87.17	9.72
	Manes.02G016200	2835	944	F	107.47	9.61
	Manes.14G042600	2727	908	D	102.73	9.32
	Manes.06G128700	2733	910	A	102.97	9.40
	Manes.16G092100	2778	925	E	103.03	9.54
	Manes.S089900	2853	950	F	104.77	8.90
	Manes.09G172500	2745	914	D	107.95	9.74
<i>Picea glauca</i>	-	-	-	-		
<i>Pinus pinaster</i>	PPI0048188	2936	968	B	108.74	9.44
	PPI00071086	2211	729	D	83.61	9.28
	PPI00075807	2751	907	D	102.90	8.75
<i>Populus trichocarpa</i>	Potri,001G098300	2850	949	D	107.76	9.72
	Potri.003G133300	2847	948	D	107.58	9.81
	Potri.001G070900	2781	926	D	104.18	9.32
	Potri.003G159800	2781	926	J/H	104.32	9.71

	Potri.016G112200	2559	852	E	97.75	9.84
	Potri.006G137300	2781	926	D	105.44	9.65
	Potri.005G026200	2621	886	B	101.01	9.47
	Potri.006G097200	2541	846	J/H	102.74	9.70
	Potri.015G109800	2730	909	D	103.01	9.51
	Potri.012G111600	2730	909	D	97.57	9.40
<i>Prunus persica</i>	Prupe.5G138300	2826	941	D	105.24	9.20
	Prupe.1G211000	2916	971	D	108.88	9.54
	Prupe.7G193000	2721	906	E	102.86	9.02
	Prupe.6G088800	2580	859	J/H	98.50	8.92
	Prupe.5G107400	2895	964	D	109.49	9.67
	Prupe.6G321500	2682	893	B	101.96	8.89
	Prupe.5G204900	2433	810	F	92.50	8.74
<i>Ricinus communis</i>	RCO.g.29739,000141	2805	934	D	105.83	8.65
	RCO.g.29941.000003	2001	666	D	76.33	9.56
	RCO.g.30039.000013			J/H	101.23	9.38
	RCO.g.30128.000279			D	101.48	9.57
<i>Solanum lycopersicum</i>	Solyc06g068680.2	2574	857	D	97.74	9.35
	Solyc06g075570.1	2493	830	J/H	95.40	9.35
	Solyc07g042460.1	2646	881	E	100.07	9.36
	Solyc03g117980.2	2817	938	D	105.32	9.44
	Solyc01g099620.2	2598	865	B	98.74	9.07
	Solyc11g072800.1	2451	816	J/H	109.09	9.45
	Solyc08g081690.2	2892	963	D	93.68	9.17
<i>Theobroma</i>	TCA.TCM_037473	2916	971	E	110.28	9.44

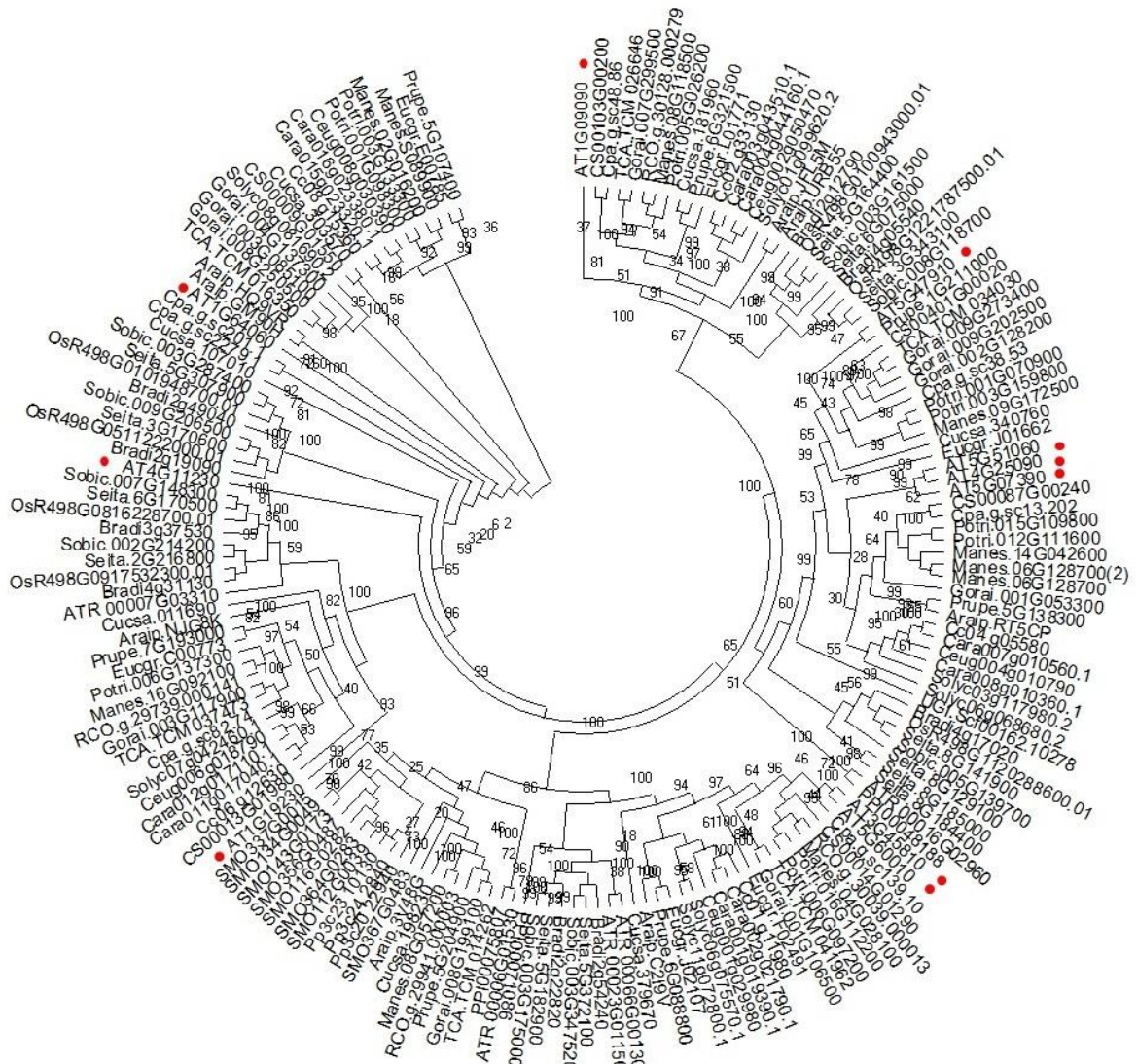
<i>cacao</i>	TCA.TCM_016350	2799	932	A	106.14	9.60
	TCA.TCM_034030	2886	961	D	108.32	9.53
	TCA.TCM_014791	2733	910	D	101.16	9.79
	TCA.TCM_026646	2670	889	B	103.42	9.82
	TCA.TCM_041962	2736	911	J/H	89.97	9.63
	TCA.TCM_014262	2361	786	D		
<i>Utricularia gibba</i>	UGI.scf00162.10278	2658	885	D	99.38	8.15
<i>Amborella trichopoda</i>	ATR_00066G00130	5148	858	D	98.92	9.50
	ATR_0001G02960	5508	918	D	103.48	9.91
	ATR_00023G01150	5178	863		99.00	9.31
	ATR_00007G03310	5550	925	F	104.69	9.31
	ATR_00006G101530	5382	897		102.63	9.30
<i>Brachypodium distachyon</i>	Bradi2g19090	2970	989	I	110.43	9.58
	Bradi4g31130	2976	991	E	111.13	9.73
	Bradi2g127090	2706	901	B	101.59	9.73
	Bradi2g54240	2725	907	D	101.57	9.62
	Bradi2g49040	2832	943	I	106.38	9.93
	Bradi2g22820	2157	718	B	81.76	9.73
	Bradi4g17020	2775	924	E	104.30	8.50
	Bradi4g05540	2568	855	D	97.14	9.68
	Bradi3g37530	2964	987	D	109.82	9.75
<i>Chlamydomon as reinhardtii</i>						
<i>Oryza sativa</i>	OsR498G0102283700.01	2532		D	101.77	9.74

	OsR498G010943000.01	2718	905	B	107.19	9.69
	OsR498G0511222000.01	2856	951	I	106.24	9.57
	OsR498G0101948700.01	2832	943	I	102.14	9.36
	OsR498G1221787500.01	2730	909	B	112.23	9.73
	OsR498G0917532300.01	3027	1008	D	105.29	9.49
	OsR498G1120288600.01	2817	938	D	109.97	9.89
	osR498G0816228700.01	2946	981	E	106.24	9.36
<i>Physcomitrella patens</i>	Pp3c20_22940	2883	960	F		
	Pp3c10_24760	2922	973	F	108.82	8.64
					107.90	9.43
	Pp3c24_2840	2859	952	F		
	Pp3c23_10130	2754	917	F	104.48	9.25
<i>Selaginella moellendorffii</i>	SMO112G0039	2205	734	F	84.07	9.17
	SMO367G0483	2136	711	F	80.98	8.90
	SMO116G0282	2082	693	F	79.65	9.53
	SMO164G0192	2538	845	F	96.92	9.31
	SMO143G0173	2706	901	F	102.96	9.68
	SMO356G0487	2148	715	F	81.82	8.72
	SMO134G0049	2688	895	F	101.07	9.85
	SMO337G0015	2460	819	F	93.18	9.96
<i>Setaria italica</i>	Seita.5G372100	2547	848	D	95.95	9.91
	Seita.5G307900	2877	958	I	107.76	9.59
	Seita.3G170600	2892	963	I	108.26	9.68
	Seita.8G141900	2796	931	D	104.87	9.68
	Seita.5G164400	2700	988	B	101.58	9.55
	Seita,8G185000	2577	858	E	97.41	8.70
	Seita.6G170500	3030	1009	E	111.85	9.93
	Seita.2G216800	3033	1010	D	111.96	9.41

<i>Sorghum bicolor</i>	Seita.8G129100	2862	953	B	106.91	9.04
	Seita.3G343100	2691	896	D	99.78	9.62
	Seita,6G075000	2118	705	D	80.23	9.12
	Seita,5G182900	2472	823	D	93.34	8.30
	Sobic.002G014200	3024	1007	E	112.09	9.28
	Sobic.007G148300	3027	1008	E	112.96	9.92
	Sobic.005G139700	3240	1079	D	120.59	9.94
	Sobic.003G47520	2565	854	D	96.56	9.80
	Sobic.003G175000	2484	827	D	93.66	9.76
	Sobic.009G206500	2874	957	I	107.47	9.81
	Sobic.003G161500	2775	924	B	103.94	9.60
	Sobic,008G118700	2751	916	B	101.78	8.90
Sobic.003G287400	2688	895	I	100.97	9.34	

As sequências obtidas foram utilizadas para análises filogenéticas. As análises filogenéticas mostra que nem todos as cópias paralogas de genes de Rboh em *A. thaliana* apresentam homólogos nas demais espécies vegetais analisadas. Os genes de *A. thaliana* estão divididos em 6 grupos com suporte filogenético acima de 50% (Figura 9). No entanto, os grupos RbohC, RbohA e RbohG foram identificados apenas em *Arabidopsis thaliana* (tabela 5).

Figura 9: **Análise filogenética em máxima verossimilhança de Rboh em plantas.** Foram utilizadas 172 seqüências de aminoácidos de Rboh, obtidas do genoma de 27 espécies. As seqüências de *A. thaliana* estão indicadas por pontos vermelhos. Os valores representados nos clados indicam a porcentagem do *bootstrap* obtido.



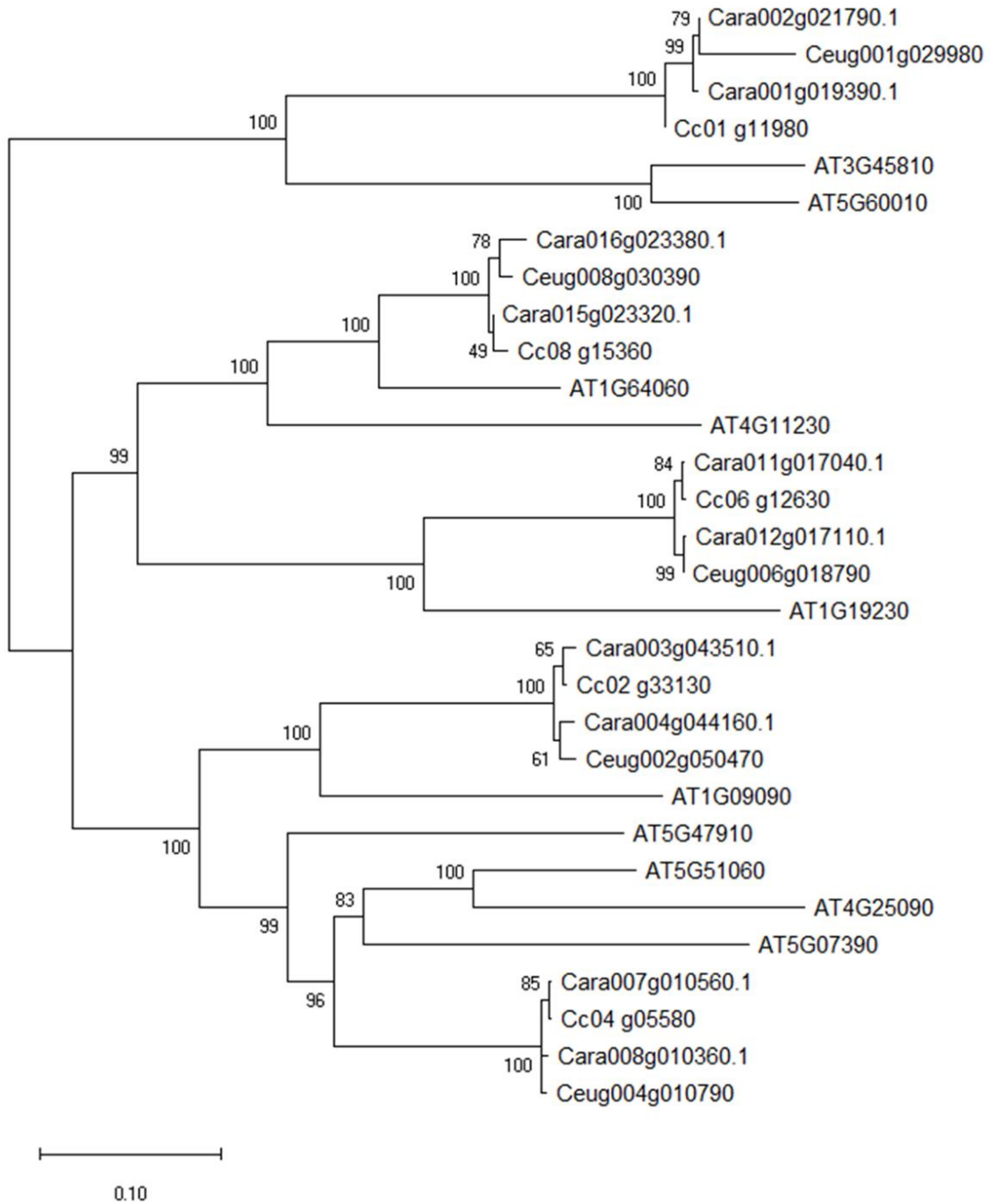


Figura 10: Análise filogenética de máxima verossimilhança com sequências proteicas de Rboh em *A. thaliana*, *C. canephora*, *C. arabica* e *C. eugenoides*. Os valores representados nos clados indicam a porcentagem do *bootstrap* obtido.

Para as análises de substituições sinônimas e não sinônimas, as sequências codificantes dos genes codificantes para Rboh foram divididas nos seguintes grupos: todas as espécies, eudicotiledôneas, monocotiledôneas, gênero *Coffea*, gimnospermas e espécies basais (Tabela 6). Indicam que a enorme maioria dos grupos apresentou seleção purificadora, enquanto o gênero *Coffea* sofreu uma pressão seletiva neutra. Espécies dicotiledôneas apresentam pressão de seleção mais intensa que monocotiledôneas.

Tabela 6: Taxas de substituições de nucleotídeos sinônimas (dS) e não sinônimas (dN) em genes Rboh.

Grupo	d(S)	d(N)	d(N)/d(S)
Eudicotiledôneas	2.15±0.02	0.35±0.01	0.162
Monocotiledôneas	0.66±0.01	0.26±0.01	0.393
Gimnospermas	0.76±0.002	0.23±0.001	0.289
Basais	0.74±0.01	0.22±0.01	0.297
Gênero <i>Coffea</i>	0.77±0.43	0.77±0.45	1
<i>Coffea arabica</i> x <i>Coffea canephora</i>	0.51±0.45	0.27±0.001	0.473
<i>Coffea arabica</i> x <i>Coffea eugenioides</i>	1.14±0.39	0.28±0.01	0.245
<i>Coffea eugenioides</i> x <i>Coffea canephora</i>	1.49±0.42	0.32±0.01	0.214

Foram ainda analisadas as taxas de seleção positiva ou negativa em sítios específicos de sequências completas de aminoácidos de Rboh. Foram encontrados resíduos com seleção positiva em monocotiledôneas e no gênero *Coffea* usando o modelo M8a ($ws \geq 1$).

Tabela 7: Sítios de seleção positiva com base nas análises do programa Selecton. Modelos evolutivos M5 (gama), M7 (beta), M8 a ($ws \geq 1$) e M8a ($ws=1$).

Modelo	Grupo	dN/dS	Log-likelihood	Sítios de seleção positiva
M5 (gama)	Eudicotiledôneas	0.162		
	Monocotiledôneas	0.393	-60534.1	
	Coffea	1	-16783.3	
	Gimnospermas	0.289		
	Basais	0.297		
M7 (beta)	Eudicotiledôneas	0.162		
	Monocotiledôneas	0.393		
	Coffea	1	-16782	
	Gimnospermas	0.289	-8474.92	
	Basais	0.297	-37230.6	
	Eudicotiledôneas	0.162		
	Monocotiledôneas	0.393	-60520.1	5, 7, 9, 12, 13, 14, 22, 32, 33, 37, 78, 79, 84 , 86, 87, 89 , 90, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 175, 176, 177, 179, 186, 553
	Coffea	1	-16779	32, 65, 66, 71, 73, 81, 84 , 89 , 270, 465, 532
	Gimnospermas	0.289	-8467,65	

	Basais	0.297	-37218	
M8a (ws=1)	Eudicotiledôneas	0.162		
		0.393		
	Monocotiledôneas	1	-60550.3	
	Coffea	0.289	-16770	
	Gimnospermas	0.297	-8470.2	
	Basais		-37228.5	

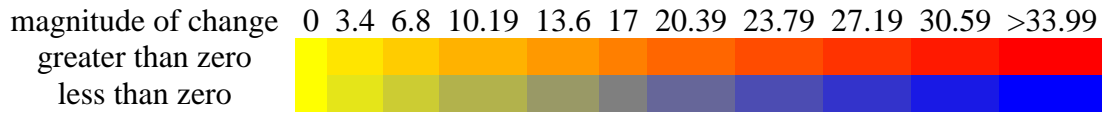
Tabela 8: **Taxa de substituição sinônimas (dS) e não-sinônimas (dN), e análises de sítios de seleção positiva.** Modelos evolutivos FEL e SLAC.

Grupo	dN/dS	Sítios com seleção positiva		Análise integrativa
		FEL	SLAC	
Eudicotiledôneas	0.162	-		
Monocotiledôneas	0.393	-	151, 366	151, 366
Gênero Coffea	1	-	-	
Gimnospermas	0.289	-	-	
Basais	0.297	-	798	798

As taxas de expressão de genes contendo o domínio IPR013623 apresentam predomínio em raiz em *A. thaliana* (figura 11). Em monocotiledôneas (*Brachypodium distachyon* e *Oryza sativa*) há o predomínio em antera (figuras 12 e 13), com exceção de *Sorghum bicolor* onde ocorre o predomínio em pistilo (figura 14). Nesse sentido, uma análise comparativa contemplando os demais domínios ainda poderá melhor detalhar a expressão de Rboh.

Figura 11: **Taxas de expressão em TPM de *A. thaliana* em flor, fruto, folha e raiz**

Arabidopsis thaliana

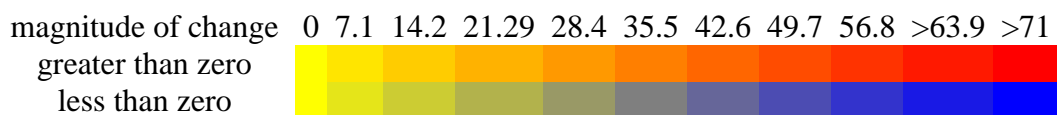


FlorFrutoFolhaRaíz

11 10 7 34

Figura 12: Taxas de expressão em TPM de *B. distachyon* em antera, endosperma, folha e pistilo

Brachypodium distachyon

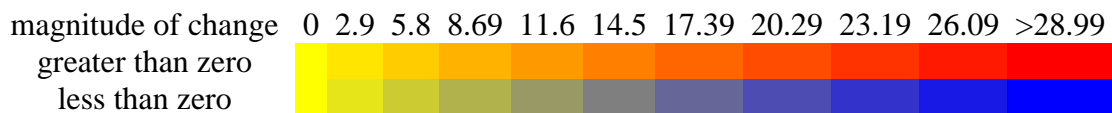


AnteraEndospermaFolhaPistilo

71 18 12 12

Figura 13: Taxas de expressão em TPM de *O. sativa* em antera, endosperma, folha e pistilo

Oryza sativa



AnteraEndospermaFolhaPistilo

29 7 5 5

Figura 14: Taxas de expressão em TPM de *S. bicolor* em antera, endosperma, folha e pistilo

Sorghum bicolor



AnteraEndospermaFolhaPistilo

35 14 13 54

5. Conclusão

A família gênica da Rboh é formada por 10 membros em *A. thaliana*. Verificamos que os parálogos RbohC e RbohG são exclusivos de *A. thaliana*. Em monocotiledôneas

encontramos apenas os homólogos RbohB, Rboh D, RbohE e RbohI. As taxas de substituição de nucleotídeos mostram que os genes de Rboh sofrem seleção purificadora, especialmente em dicotiledôneas.

A expressão dos genes de Rboh é alta em tecidos reprodutivos em monocotiledôneas.

Referências

CHAPMAN, Jordan M. et al. RBOH-dependent ROS synthesis and ROS scavenging by plant specialized metabolites to modulate plant development and stress responses. **Chemical research in toxicology**, 2019.

CHENG, Chenxia et al. Genome-wide analysis of respiratory burst oxidase homologs in grape (*Vitisvinifera* L.). **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 12, p. 24169-24186, 2013.

CZARNOCKA, Weronika; KARPIŃSKI, Stanisław. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 122, p. 4-20, 2018.

DEL CASTELLO, Fiorella et al. The era of nitric oxide in plant biology: Twenty years tying up loose ends. **Nitric Oxide**, 2019.

EDGAR, Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acid sresearch*, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

JOURDA, Cyril et al, Expansion of banana (*Musa acuminata*) gene families involved in ethylene biosynthesis and signalling after lineage-specific whole-genome duplications, *New Phytologist*, v, 202, n, 3, p, 986-1000, 2014

KELLER, Oliver et al. A novel hybrid gene prediction method employing protein multiple sequencea lignments. *Bioinformatics*, v. 27, n. 6, p. 757-763, 2011.

KOIVUSALO, M.; Baumann, M.; Uotila, L. Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett.* 1989, 257, 105–109.

KUMAR, Sudhir et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.

LI, Dahui et al. Evolutionary and functional analysis of the plant-specific NADPH oxidase gene family in *Brassica rapa* L. **Royal Society open science**, v. 6, n. 2, p. 181727, 2019.

LIGHTFOOT, Damien J. et al. Identification and characterisation of barley (*Hordeum vulgare*) respiratory burst oxidase homologue family members. **Functional plant biology**, v. 35, n. 5, p. 347-359, 2008.

MARINO, Daniel et al. A burst of plant NADPH oxidases. **Trends in plant science**, v. 17, n.

1, p. 9-15, 2012.

MILLER, Gad et al. The plant NADPH oxidase RbohD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. **Sci. Signal.**, v. 2, n. 84, p. ra45-ra45, 2009

MITCHELL, Alex L. et al. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D351-D360, 2018.

MITTLER, Ron. ROS are good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.

PAPATHEODOROU, Irene et al. Expression Atlas: gene and protein expression across multiple studies and organisms. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D246-D251, 2017.

PROOST, S. et al. PLAZA 3.0: an access point for plant comparative genomics. **Nucleic acids research**, v. 43 (D1), p. D974-D981, 2015

SOLOVYEV, V.; DIRECTOR OF BIOINFORMATICS. Statistical approaches in eukaryotic gene prediction. **Handbook of statistical genetics**, 2004.

STERN, Adi et al. Selecton 2007: advanced models for detecting positive and purifying selection using a Bayesian inference approach. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl_2, p. W506-W511, 2007.

TIAN, Fengxia et al. Genome-wide identification, classification, and expression analysis of 14-3-3 gene family in Populus, **PloSone**, v. 10, n. 4, p. e0123225, 2015.

TICHÁ, Tereza et al. Redox regulation of plant S-nitrosoglutathione reductase activity through post-translational modifications of cysteine residues. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 494, n. 1-2, p. 27-33, 2017.

VAN BEL, Michiel et al. PLAZA 4.0: an integrative resource for functional, evolutionary and comparative plant genomics. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D1190-D1196, 2017.

VAN BREUSEGEM, Frank; FOYER, Christine; MANN, Giovanni. Reactive oxygen species are crucial “pro-life “survival signals in plants. 2018.

XIA, Xuhua. DAMBE6: New Tools for Microbial Genomics, Phylogenetics, and Molecular Evolution. **Journal of Heredity**, v. 108, n. 4, p. 431-437, 2017.

WANG, Gang-Feng et al. Characterization of rice NADPH oxidase genes and their expression under various environmental conditions. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 5, p. 9440-9458, 2013.

ZHANG, Zaibao et al. Genomic, molecular evolution, and expression analysis of NOX genes in soybean (*Glycine max*). **Genomics**, 2018.

CAPÍTULO 4

O ácido hexanoico é capaz de modular EROs e ERNs em *Coffea arabica*?

1. Introdução

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas instáveis e altamente reativas, formadas pela redução incompleta de O_2 em H_2O , com capacidade de transformar outras moléculas com as quais colidem. Elas contêm radicais superóxidos (O_2^-), que em níveis atenuados podem atuar como sinalizadores moleculares em diversas situações fisiológicas (Mittler, 2017). Entretanto, a geração excessiva de EROs pode causar danos a proteínas, clorofila, DNA, vazamento iônico e pode levar a morte celular (Del Castello et al., 2019). A produção e degradação de EROs pode ocorrer na membrana plasmática, mitocôndria, cloroplasto, retículo endoplasmático e peroxissomas (Van Breusegem et al, 2018; Czarnocka e Karpiński, 2018).

Em plantas, a principal fonte de EROs é proveniente da oxidação de NADPH catalisada por O_2^- (Marino et al., 2013; Cheng et al., 2013). O NADPH funciona como um doador de elétrons citosólico ao reduzir o O_2 extracelular. NADPH oxidases são proteínas membranares, que por meio da fosforilação de seu domínio N-terminal doam um elétron para O_2 , gerando assim o superóxido (O_2^-). NADPH oxidases são codificadas por uma família gênica denominada, em inglês, “*Respiratory burst oxidase homologs*” (Rboh) (Marino et al., 2012; Cheng et al., 2013). Em *Arabidopsis thaliana* ocorrem 10 genes na família gênica Rboh (RbohA-RbohJ). Entre os parálogos da família gênica, RbohD e RbohF são expressos principalmente em tecidos da parte aérea da planta e promovem uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo favorecendo a respostas de defesa a patógenos (Angelos et al., 2018). Nas folhas, AtrbohD gera EROs relacionadas ao reconhecimento de patógenos e, juntamente com RbohF, também está relacionada ao fechamento estomático (Chapman et al., 2019).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre sem carga que possui elétrons desemparelhados permitindo que atue como um sinalizador molecular envolvido em diversos processos biológicos como, crescimento radicular, fechamento estomático, germinação e resposta a fatores de estresse biótico ou abiótico (Kovacs et al., 2016; Lindermayr, 2018) ao alterar o estado redox de outras biomoléculas (Frunghillo et al., 2014). O NO faz parte de uma família de moléculas reativas de nitrogênio (ERNs), o qual inclui também o grupo S-nitrosotiol (SNOs) (Leterrier et al., 2011; Lindermayr, 2018; Jahnova et al., 2019).

Os SNOs são importantes moléculas estáveis que servem como fonte de reserva e transporte de NO em plantas (Jahnova et al., 2019). Eles são formados por S-nitrosilação, que é uma adição seletiva e reversível da porção de óxido nítrico ao átomo de enxofre das cisteínas, que ocorre em tióis e proteínas de baixo peso molecular. A S-nitrosilação é considerada uma importante modificação pós-traducional de proteínas baseada em oxirredução, sendo parte integrante das vias de sinalização de NO e ERNs. Pode estar relacionada a diversos processos fisiológicos como regulação da homeostase, transcrição de proteínas e morte celular programada (Jahnova et al., 2019).

Entre os SNOs, a S-nitrosoglutationa (GSNO), formada pela S-nitrosilação de glutathione, é considerada o SNO mais abundante em plantas, correspondendo à principal reserva móvel de NO (Leterrier et al., 2011; Jahnova et al., 2019). A enzima S-nitrosoglutationa redutase (GSNOR) realiza a redução de GSNO em uma reação dependente de NADH, e é considerada uma reação chave na mediação dos níveis celulares de GSNO e NO (Lindermayer, 2018). A ação enzimática de GSNOR leva à formação de dissulfeto de glutathione (GSSG) e amônio (Liu et al., 2001). Esta enzima altamente conservada é codificada por um gene de cópia única em diversas plantas angiospermas (Xu et al., 2013).

O café é um dos principais produtos do sistema agroindustrial brasileiro e mundial. As espécies mais comercializadas são *Coffea arabica* (conhecido como café arabica) e *Coffea canephora* (robusta ou conilon). O gênero *Coffea* pertence a família Rubiaceae, subfamília Ixoroidaeae, que possui 124 espécies (Davis et al., 2011). A espécie *Coffea arabica* é originária do sudeste da Etiópia e é a única espécie alotetraplóide do gênero ($2n = 2x = 44$ cromossomos) (Clarindo e Carvalho et al., 2008). O genoma de *Coffea arabica* tem origem na fusão dos genomas, há menos de 1 milhão de anos, de duas espécies diploides: *Coffea canephora* (subgenoma CaCc) e *Coffea eugenioides* (subgenoma CaCe) (Yu et al., 2011).

No Brasil o café é cultivado durante o inverno em regiões com temperaturas de aproximadamente 10°C. Baixas temperaturas levam as plantas a uma condição de estresse, podendo afetar a transferência de energia na cadeia transportadora de elétrons devido a fotoinibição de membranas. Sendo assim, é necessário que durante a aclimação vegetal, ocorra uma reestruturação fisiológica e bioquímica de membranas plasmáticas. Essa reestruturação é possível devido a ação de EROs que promovem a peroxidação de cadeias lipídicas de membrana aumentando sua fluidez. (De Oliveira et al., 2009)

O ácido hexanoico ($C_6H_{12}O_2$) é um ácido carboxílico de seis carbonos derivado do hexano. Ele é um potente agente eliciador natural com eficiência comprovada em uma ampla gama de plantas hospedeiras e patógenos. Pode induzir a ativação precoce de defesas de amplo

espectro, induzindo a deposição de calosidade e as vias de ácido salicílico e ácido jasmônico (Aranega-Bou et al, 2014).

O ácido hexanoico parece ter um efeito atenuante no estresse oxidativo.. Morangos (*Fragaria ananassa*) expostos a baixas temperaturas e tratados com ácido hexanoico apresentaram uma redução nas concentrações de MDA, H₂O₂ e O₂⁻, indicando um aumento na atividade de enzimas antioxidantes (Fu et al., 2011). O mesmo efeito foi observado em tomates inoculados com o patógeno *Botrytis cinera* e em melão (*Cucumis melo*) infectados com o vírus MNSV (*melon necrotic spot virus*) (Finiti et al., 2014; Fernández-Crespo et al., 2017)

Enquanto indutor de resistência, o Hx não é tóxico para a planta; entretanto, substâncias indutoras de resistência induzem a produção de EROs e estão relacionadas com o sistema antioxidante e produção de NO em plantas (Rasul et al., 2012; Savvides et al., 2016). A indução de muitos genes que caracterizam o efeito eliciador do ácido hexanoico (Hx), especialmente aqueles relacionados à defesa e à rede de sinalização e ao controle do estresse oxidativo já foi observada em diversas espécies vegetais (Aranega-Bou et al, 2014).

Sendo assim, é possível especular que a produção de moléculas relacionadas ao sistema antioxidante e do óxido nítrico sejam moduladas pela aplicação de ácido hexanoico.

.

2. Objetivos

- Avaliar se o ácido hexanoico modula geração de EROs e ERNs em *Coffea arabica*;
- Avaliar a expressão gênica de GSNOR em folhas maduras e raízes laterais após a aplicação de ácido hexanoico em solução nutritiva;
- Avaliar se RbohD, um gene induzido transcricionalmente por estresse oxidativo, é modulado pelo ácido hexanoico

3. Materiais e métodos

3.1 Material vegetal e tratamento

Foram utilizadas plantas de tamanho uniforme de *C. arabica* (cv. Catuaí Vermelho IAC 144), com três a quatro pares de folhas para uso nos experimentos. As plantas foram adquiridas junto a viveiros certificados.

As mudas foram transferidas para vasos escuros contendo 3L de solução nutritiva aerada (SNA), adaptada de Clark (1975) por Carvalho et al. (2013). As plantas foram mantidas em

aclimação prévia por 96h. O pH das soluções foi ajustado entre 5,5 e 6,0 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico diariamente. Após esse período, a solução nutritiva foi substituída. Foram então impostos os seguintes tratamentos: a) SNA (controle); b) SNA + ácido hexanoico (0,6 mM, Merck) assim como recomendado na revisão de Aranega-Bou et al. (2014). As plantas foram cultivadas em ao menos 3 parcelas (vasos plásticos) com 3 plantas (repetições) para cada tratamento. Os experimentos foram realizados em sala de crescimento de plantas, com temperatura regulada para 21°C e ciclo de 12h dia/noite, com iluminação artificial com painéis de LED de densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de aproximadamente $400\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Foram coletados um par de folhas do terço médio de cada planta e raízes laterais das plantas em solução nutritiva após 48 horas de tratamento, preferencialmente entre 9h00 e 10h30min da manhã.

3.2 Fotossíntese e fluorescência de clorofila

Foram realizadas medições imediatamente antes da imposição dos tratamentos, 24 e 48 horas após a imposição dos tratamentos. A medição em 48h foi imediatamente antes da coleta de material para análises bioquímicas e moleculares. Todas as medições foram realizadas entre 9:30 e 11h da manhã, entre 3 e 5 horas após a retomada do ciclo de luz na sala de crescimento.

As medidas da fluorescência da clorofila *a* foram realizadas em folhas maduras, localizadas no terço médio da parte aérea por meio de um fluorômetro modulado (Junior PAM, Heinz-Walz). Foram escolhidas aleatoriamente cinco parcelas (vasos) por tratamento e uma repetição (um indivíduo) de cada parcela para medição da fluorescência de clorofila. As medidas foram realizadas adotando-se o método do pulso de saturação em folhas pré-adaptadas ao escuro por 30 minutos. Com essas variáveis foi estimada a eficiência quântica potencial do fotossistema II (FSII) F_v/F_m , em que F_v é a fluorescência variável ($F_v = F_m - F_o$), F_m é fluorescência máxima e F_o é a fluorescência inicial.

As determinações de trocas gasosas foram realizadas com um sistema fechado portátil de fotossíntese, IRGA, modelo LI-6400xt-LI-COR (Lincoln, NE, EUA), com concentração de CO_2 na câmara de medidas de $400\mu\text{mol mol}^{-1}$, concentração essa que foi obtida e mantida pelo injetor de CO_2 6400-01(LI-COR, EUA) acoplado ao equipamento. E a DFFFA fornecida por luz artificial de LED (6400-40 LCF, LI-COR, EUA) com intensidade de $600\mu\text{mol}$. As medidas foram feitas sempre na região mediana de folhas maduras. Determinações de assimilação líquida de CO_2 foram feitas entre 9:30 e 11 horas da manhã.

3.3 Emissão de NO por folhas e raízes de *C. arabica*

A quantificação de NO em folhas e raízes laterais foi realizada pela incubação direta com a sonda DAF-2 para eliminação da interferência de compostos intracelulares que podem reagir com NO (Zhang et al., 2002). A metodologia foi adaptada a partir do método descrito por Oliveira et al. (2009) adaptado de Ye et al. (2004). Foram feitas análises de 40 mg de raízes ou folhas incubadas por 1 h, a 25°C, no escuro e na presença de DAF-2 (75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) diluído em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ (pH 7,2). Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 7.500 g para a precipitação celular e o sobrenadante diluído 9x em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ (pH 7,2). A emissão de fluorescência de DAF-2T foi analisada em espectrofluorímetro entre 500 e 550 nm sob excitação de 495 nm. A quantificação da emissão de NO foi calculada por meio de uma curva padrão obtida utilizando-se uma solução aquosa saturada de NO. Esta atividade foi realizada na Universidade Estadual de Londrina, com colaboração do Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira (Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Animal e Vegetal).

3.4 Conteúdo de S-Nitrosotiol e nitrito em folhas e raízes

A quantificação de S-nitrosotiois e nitrito foi realizada de maneira similar à descrita nos trabalhos de Oliveira et al. (2016) e Silveira et al. (2019). Para a extração de S-nitrosotiol, as folhas e raízes (100mg) foram maceradas em água deionizada por 40 minutos. As amostras foram analisadas pelo sensor Analisador de Radicais Livres Apollo TBR 4100/1025 (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA), utilizando sensor específico de NO (ISSO-NOP 2mm). Para a extração de nitrito alíquotas de 0,2mL da suspensão de folhas e raízes foram adicionadas a amostras contendo 10mL de solução aquosa de cloreto de cobre (CuCl₂ 0.1M) que catalisa a liberação de NO a partir de S-NO. Alíquotas de 0,2mL de suspensão de folhas e raízes foram adicionadas a solução aquosa de ácido sulfúrico e iodeto de potássio (H₂SO₄ + KI), capaz de reduzir NO₂ em NO. Os dados foram analisados por análise de variância (one-way ANOVA), seguido pelo teste de Tukey (p<0.05). Estas análises foram realizadas com colaboração da Profa. Dra. Amedea Seabra (Universidade Federal do ABC).

3.5 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A quantificação de H₂O₂ foi realizada adaptando o método de Gay e colaboradores (1999). Os tecidos (50 mg) foram macerados em 250 μL de metanol, com o auxílio de

nitrogênio líquido. Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 10.000 xg por 5 minutos. Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante será retirada, à qual adicionamos 500 µL de FeSO₄ 1 mmol.L⁻¹ e 100 µL de H₂SO₄ 1 mmol.L⁻¹. A mistura foi incubada por 5 minutos no escuro. A seguir, foi adicionado 100 µL de alaranjado de xilenol (xilenol Orange) 1 mmol.L⁻¹ e a mistura será novamente incubada no escuro por 20 minutos. A absorbância será lida a 595 nm em um espectrofotômetro. Os resultados serão normalizados pela massa fresca inicial de cada amostra. Esta atividade foi feita no Laboratório de Genética Fisiológica da ESALQ-USP, com colaboração do Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo e Dra. Salete Gaziola.

3.6 Quantificação de Glutathiona redutase

A quantificação de GR será baseada no método de Gomes-Junior et al. (2006), adaptado. Foi adicionado 50 µL de extrato vegetal em uma solução contendo DTNB (2-ácido nitrobenzóico) 1 mM dissolvido, GSSG (glutathiona oxidada) 1 mM e NADPH a 0,1 mM dissolvidos em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5). A atividade da GR foi estimada pela redução de glutathiona oxidada acompanhada por monitoramento na alteração da absorbância a 412 nm por 1 minuto. Esta atividade foi feita no Laboratório de Genética Fisiológica da ESALQ-USP, com colaboração do Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo e Dra. Salete Gaziola.

3.7 Quantificação de enzimas antioxidantes: catalase (CAT), ascorbato peroxidase(APX) e superóxido dismutase(SOD)

Para a quantificação de CAT foi usado o método de Kraus et al. (1995) adaptado (Azevedo et al., 1998). A reação inicia com a adição de 20 µL de extrato vegetal em uma solução contendo 1.0 mL de 100mM de tampão de fosfato de potássio e 2.55 µL de H₂O₂ (solução de 30%) a 25°C. A atividade enzimática será determinada medindo a absorbância a 240 nm, o que representa a degradação de H₂O₂, comparando com um controle. A atividade CAT foi calculada usando um coeficiente de extinção de 39,4 M⁻¹ cm⁻¹.

A atividade de APX foi determinada usando o método de Nakano e Asada (1981), monitorando os níveis de oxidação de ascorbato a 290 nm e 30°C. Para o meio de reação será usado tampão de fosfato 50 mM (pH 7,0), com ascorbato 0,5 mM, EDTA 0,1 mM e H₂O₂ 0,1 mM. A reação será iniciada pela adição de ascorbato. Para os cálculos utilizamos um

coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹.

A atividade enzimática de SOD foi medida usando o método de Nishikim et al. (1972) adaptado. O extrato vegetal será obtido macerando 0.2g de tecido de folha e raiz em nitrogênio líquido com 22mg de Polivinilpolipirrolidona (PVPP) contendo 1,5 mL de tampão de extração com 1.47 mL de 0.1 M de fosfato potássio (pH 7.0), 6 µl of 0.5 M de Ditioneitol (DTT), 12 µl of 0.1 M de Fenilmetilsulfonil Fluoreto (PMSF), 0.001 M de ácido ascórbico e 22 mg de PVPP. O extrato obtido será centrifugado a 12,000 g por 10 minutos a 4°C. A atividade de SOD será medida a partir da inibição da fotoredução de azul de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolitis e Ries 1977). Ao volume de 100 µl de extrato enzimático serão adicionados 1.9 mL de meio de incubação composto por 50 mM de tampão fosfato potássio (pH = 7.8) , 14 nM de metionina, 0,1 µM de EDTA, 75 µM de NBT e 2 µM de riboflavina. As amostras serão iluminadas com lâmpada fluorescente de 20 W por 10 minutos, e as leituras ocorrerão a 560 nm. Uma unidade de SOD correspondente à quantidade de enzima que é capaz de inibir a fotoredução de NBT em 50% nas condições de ensaio. A análise para a estimativa das concentrações de proteína foi realizada utilizando albumina de soro bovino como padrão (Bradford, 1976).

Estas atividades foram feitas no Laboratório de Genética Fisiológica da ESALQ-USP, com colaboração do Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo e Dra. Salette Gaziola.

3.8 Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativo em tempo real.

A extração de RNA total de folhas maduras e raízes laterais foi feita com o kit RNeasy Plant (Qiagen). O RNA total extraído foi tratado com DNase (Turbo DNA-free kit, Thermo Fisher) e em seguida purificado com o kit RNeasy Minielute Cleanup (Qiagen). O RNA foi quantificado por fluorimetria utilizando o Qubit RNA HS assay kit, no fluorômetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher). As amostras de RNA foram reverso transcritas em cDNA utilizando o kit GoScript Reverse Transcription System (Promega), conforme instruções do fabricante.

A PCR quantitativa em tempo real foi realizada em um termociclador QuantStudio3 (Applied Biosystems). Cada reação utilizou GoTaq qPCR Master Mix (Promega) (10µL), 10 ng de cDNA, os primers para cada gene alvo (1µL por primer, 1 mM) (Tabelas 9 e 10) ou os genes de referência GAPDH e EF1-alpha (Tabela 11, Carvalho et al., 2012), em um volume final de 20 µL. As seqüências de iniciadores foram projetadas utilizando o *software* Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>), e modificadas manualmente quando necessário. Para garantia da amplificação alelo-específica de *primers*, foi empregada a estratégia de um *mismatch* no primer desenhado, de maneira similar ao trabalho de Vidal et al. (2010) e Carvalho

et al. (2014). As reações foram realizadas utilizando o seguinte perfil térmico: 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 s a 95°C e 60 s a 60°C. Todas as reações foram realizadas com triplicatas técnicas e biológicas. Controles negativos de contaminação (reações sem cDNA) foram também utilizados no experimento. A especificidade dos *primers* foi avaliada por curva de *melting*. A expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001), onde folhas e raízes em solução nutritiva foram utilizados como calibradores. Para normalização, foi utilizada a média geométrica do Ct dos dois genes normalizadores. Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 9: Genes de GSNOR em *C. arabica* e primers correspondentes usados para análises de expressão. Os primers estão indicados em Forward (F) e Reverse (R)

Gene ID	Subgenoma	Sequência 5' - 3'
Cara002g026610	CaCc	F: CGTCGATTTGGTTTGCTGATCTACA R: GTCCCGTCCAAATCTGTCCG
Cara001g025000	CaCe	F: TGTCGATTTGGTTTACTGATCTATG R: CGCCCGTCCAAATCCGTCCG

Tabela 10: Genes de Rboh em *C. arabica* e primers correspondentes usados para análises de expressão. Os primers estão indicados em Forward (F) e Reverse (R)

Gene	Subgenoma	Sequência 5' - 3'
Cara007g010560	CaCc	F: CTCGATCCGCCCTGATCACC R: GCTCGTATGATTGAGAGCGATGCT
Cara008g010360	CaCe	F: GCTCGATCCGCCCTGATCAGT R: ACTCGTATGATTGAGAGCGATGCT

Tabela 11: **Genes normalizadores.** Os primers estão indicados em Forward (F) e Reverse (R)

Gene	Sequência 5' - 3'
GAPDH	F: AGGCTGTTGGGAAAGTTCTTC
	R: ACTGTTGGAACTCGGAATGC
EF1-alpha	F: AAGGGAGCTTCCAGCTTTACCT
	R: TGTGAGAGGTGTGGCAGTCAA

4. Resultados e Discussão

4.1 O ácido hexanoico não influencia em parâmetros relacionados à fotossíntese

O tratamento com ácido hexanoico e cPTIO não afetou a assimilação de CO₂ (Figura 15) e nem o transporte de elétrons no fotossistema II (Figura 16).

Figura 15 : **Taxa de assimilação de CO₂ em folhas maduras após 48h de tratamento.** Ácido hexanoico 0,6mM (SNA + HX) e cPTIO (SNA + cPTIO; HX + cPTIO)

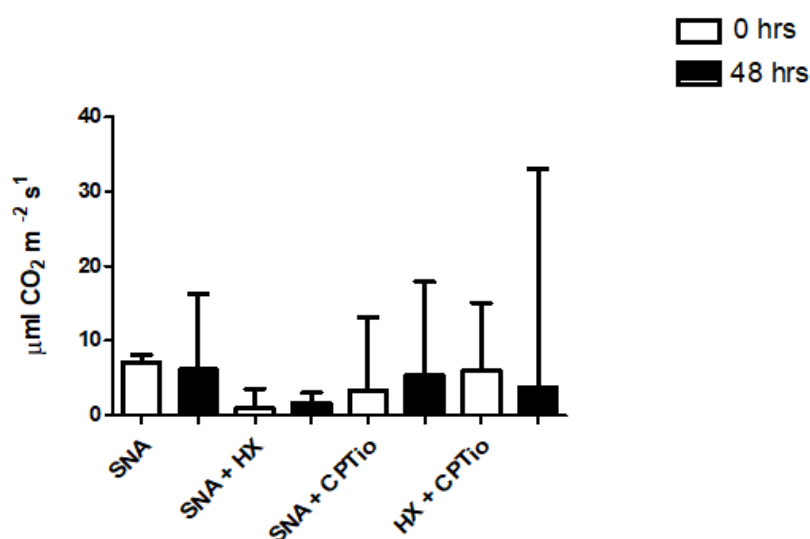
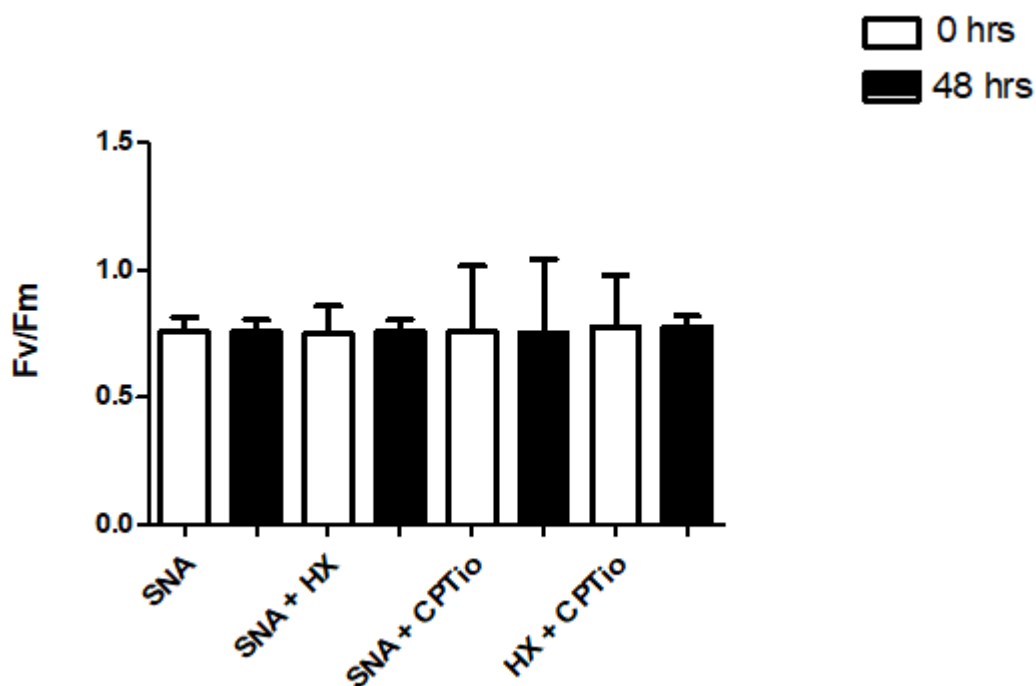


Figura 16: **Rendimento máximo do fotossistema II em folhas de *C. arabica* Catuaí após 48 horas de tratamento.** Ácido hexanoico 0,6mM (SNA + HX) e cPTIO (SNA + cPTIO; HX + cPTIO)



4.2 Espécies reativas de oxigênio

Em nossos experimentos, não detectamos H_2O_2 em raiz. Em folhas, a concentração de H_2O_2 foi induzida em folhas no tratamento com Hx (Figura 17). Um padrão similar foi observado na concentração de malondialdeído (MDA) (Figura 18): concentração de MDA foi maior em folha do que em raiz e o tratamento com Hx teve induziu o acúmulo de MDA.

Figura 17: Concentração de H_2O_2 (nmol/g) em extrato de folhas e raízes laterais de *C. arabica* tratadas com ácido hexanoico (Hx). Os asteriscos indicam diferenças significativas de concentração

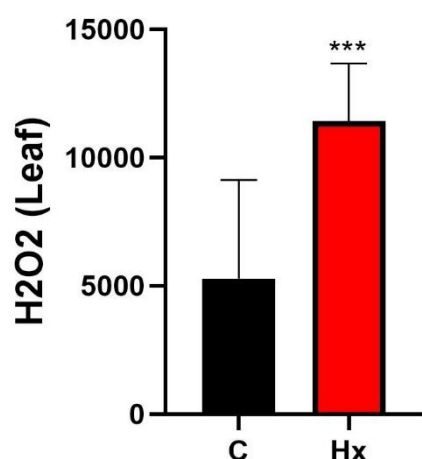
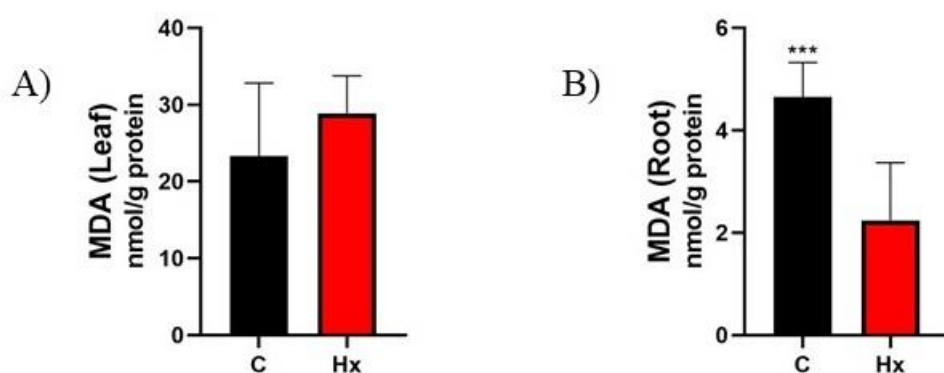


Figura 18: Concentração de Malondialdeído (nmol/g) em extrato de folhas e raízes laterais de *C. arabica* tratadas com ácido hexanoico (Hx). Os asteriscos indicam diferenças significativas de concentração.



Uma vez que validamos a hipótese de maior acúmulo de produtos relacionados a formação de EROs em plantas tratadas com ácido hexanoico, avaliamos se o perfil transcricional de uma NADPH oxidase, um importante gerador de EROs também possuiria este perfil.

Para RbohD foram identificados dois genes em *C. arabica* (Tabela 10). Sequências de proteína de *Arabidopsis thaliana* foram usadas como *query* para a identificação dos genes homeólogos de *C. canephora* e *C. eugenoides* em *C. arabica*. Identificamos que Cara008g010360 é homeólogo correspondente de *C. eugenoides* e Cara007g010560 é homeólogo correspondente de *C. canephora*.

Selecionamos para análise os ortólogos de RbohD, pois esta isoforma é uma das maiores contribuidoras na produção de espécies reativas de oxigênio em situações de estresse e em resposta a elicitores (Xie et al., 2011; Noirot et al., 2014; Liu et al., 2015; Yao et al., 2017). O padrão transcricional de RbohD CaCc (gene homeólogo de *C. canephora*) segue este mesmo padrão de indução em folhas, no tratamento Hx (Figura 19). Já o gene RbohD CaCe (gene

homeólogo de *C. eugenioides*) foi reprimido pelo tratamento Hx (Figura 20), indicando que apenas um dos genes homeólogos pode ser o agente mais importante na produção de EROs em *C. arabica*.

Figura 19: **Perfil transcricional de Rboh homeólogo CaCc de *C. arabica*.** Legenda: CCF - folhas em solução nutritiva, CHxF - Folhas tratamento ácido hexanoico, CCR - Raiz em solução nutritiva, CHxR - raízes, tratamento com ácido hexanoico.

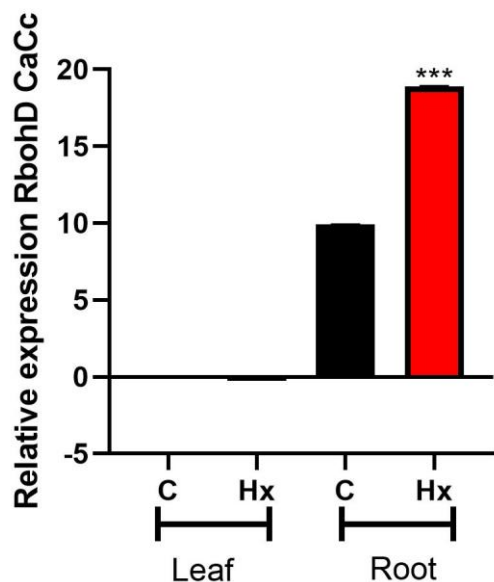
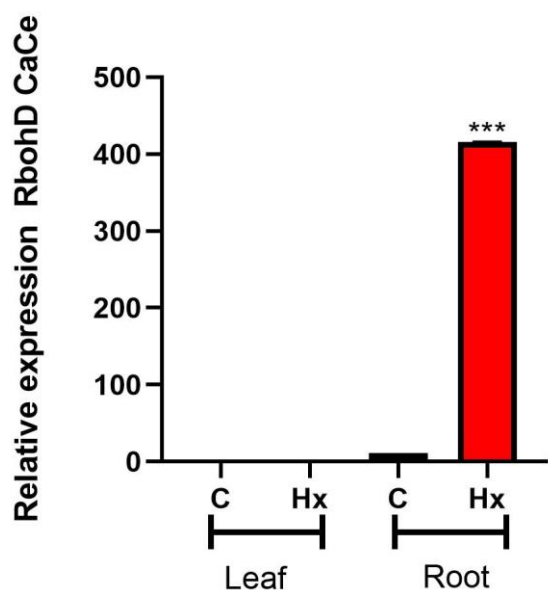


Figura 20: **Perfil transcricional de Rboh homeólogo CaCe em folhas (A) e raízes laterais (B) de *C. arabica*.** Legenda: tratamento com ácido hexanoico (CHx) e cPTIO (CHx cPTIO e CC cPTIO).



O ácido hexanoico modulou enzimas antioxidantes em raízes e folhas de maneira distinta. Enquanto em raízes tratadas com ácido hexanoico há maior atividade de CAT (figura 21) e SOD (figura 22), não houve diferenças significativas em APX (Figura 23). Para GR, o tratamento com ácido hexanoico parece diminuir a atividade da enzima (Figura 24). Já em folhas, a única enzima com diferença de atividade entre tratamentos foi APX (figura 23).

Figura 21: Atividade de catalase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) em extrato de folhas e raízes laterais de *C. arabica*.

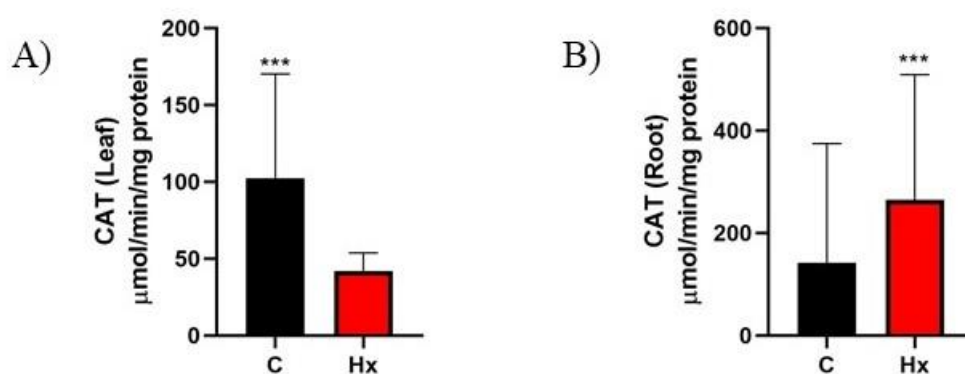


Figura 22: Atividade de SOD (U SOD/mg) determinada em extrato de folhas e raízes laterais de *C. arabica*.

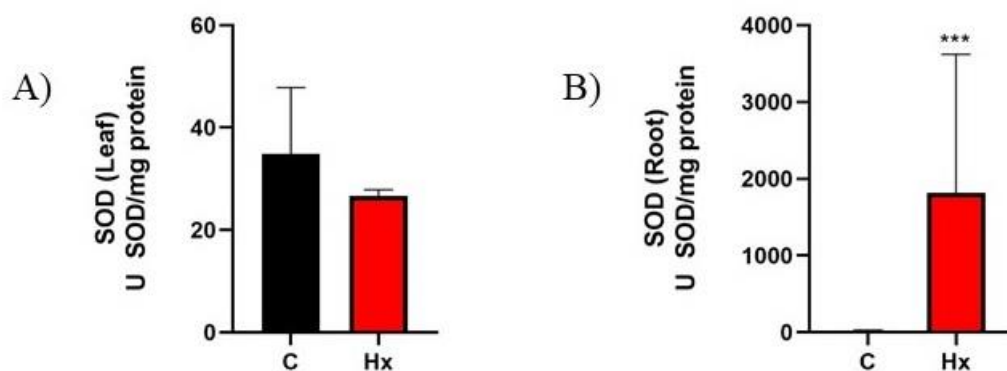


Figura 23: Atividade de ascorbato peroxidase (nmol/min/mg) determinada em extrato de folhas e raízes laterais de *C. arabica*.

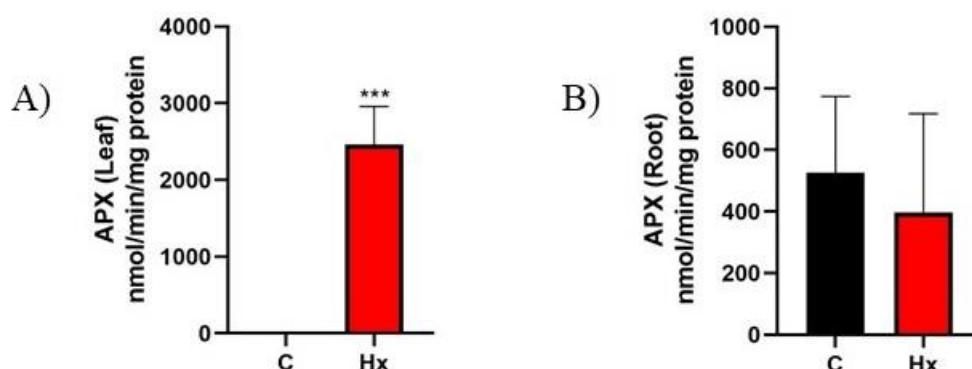
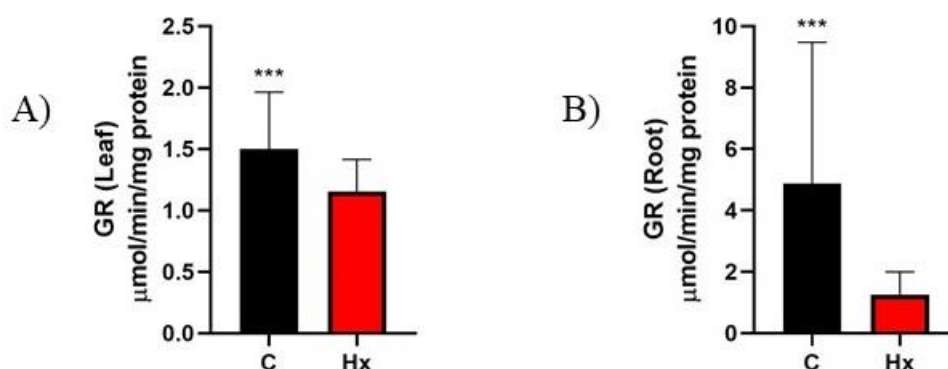


Figura 24: Atividade de Glutathiona redutase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) determinada em extrato de folhas e raízes laterais de *C. arabica*.

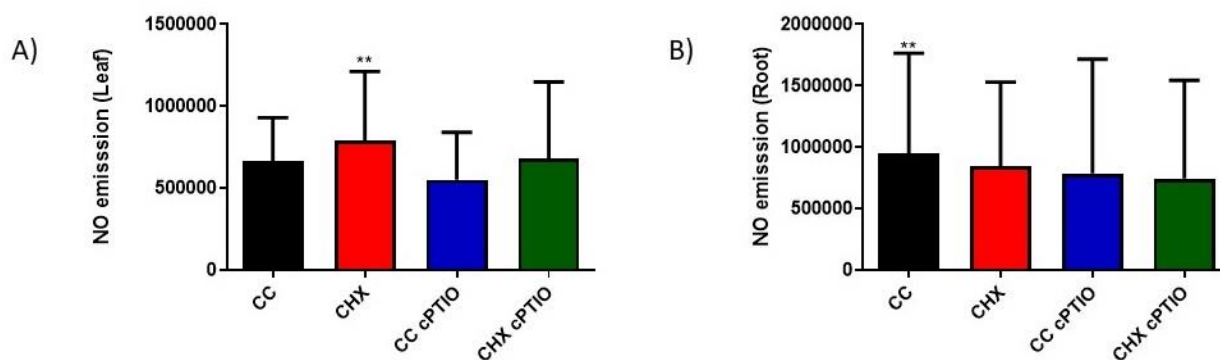


Os níveis de MDA e H_2O_2 em folhas tratadas com ácido hexanoico evidenciam a indução do estresse oxidativo em folhas maduras no tratamento com Hx.

4.3 Espécies reativas de nitrogênio

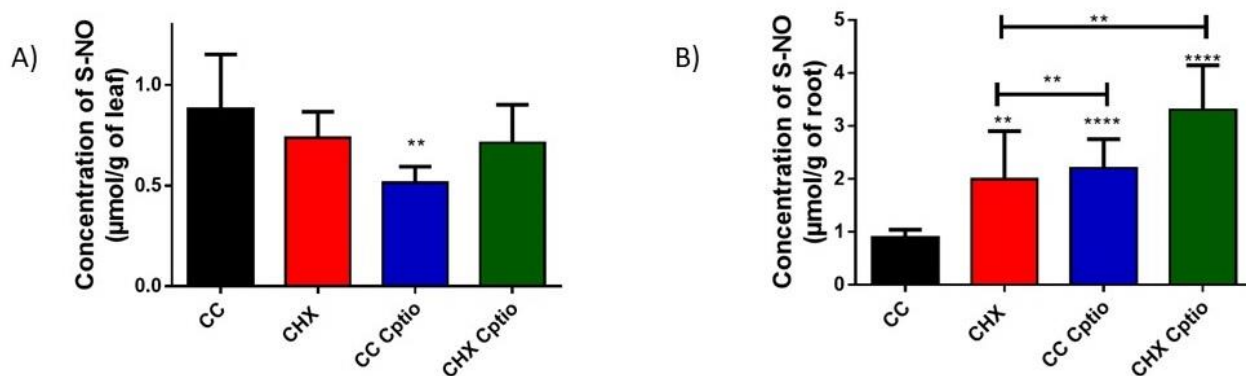
O ácido hexanoico (Hx) modulou a emissão de NO em folhas no tratamento com Hx, fato que não ocorreu em raízes (Figuras 25 B). O padrão observado nos níveis de NO em folha com Hx, corresponde ao padrão de APX. Assim como o esperado, em situações de estresse o NO estimula o sistema antioxidante (Silveira et al., 2017).

Figura 25: Emissão de NO pelo método DAF NO em folhas (A) e raízes (B) laterais de *C. arabica*



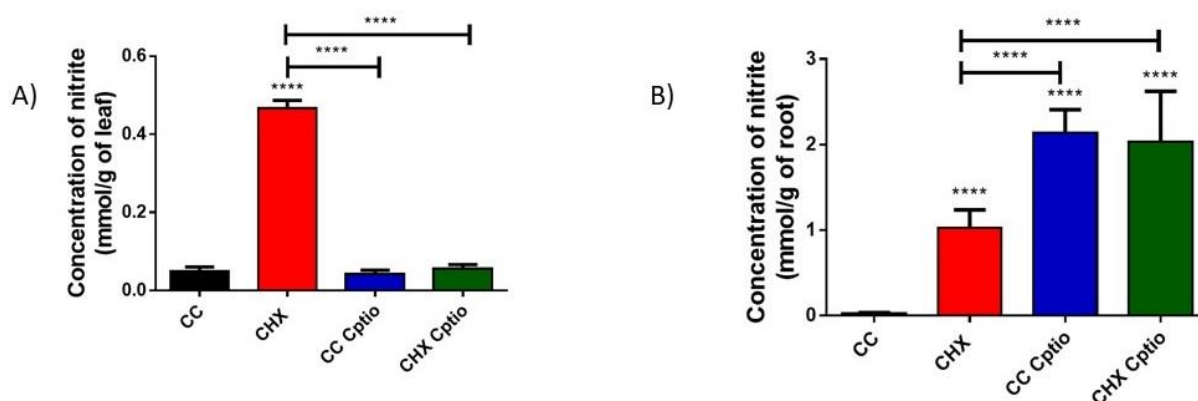
A concentração S-nitrosotiol foi analisada como indicador de biodisponibilidade de NO (Figura 26). Observou-se uma maior concentração de S-nitrosotiol em raízes tratadas com ácido hexanoico (Figura 25 B).

Figura 26: Concentração de S-nitrosotiol em folhas (A) e raízes laterais (B) de *C. arabica*



Já a concentração de nitrito em folhas foi maior em folhas e raízes tratadas com ácido hexanoico (Figura 27).

Figura 27: Concentração de nitrito (mmol/g) em folhas (A) e raízes laterais (B) de *C. arabica*



Foram identificados 2 genes de *C. arabica* para GSNOR (Tabela 9). Sequências de proteína de *Arabidopsis thaliana* foram usadas como *query* para blastP contra genomas de *C. canephora* e em *C. eugenioides* para a identificação de genes homeólogos de *C. arabica*. Identificamos que Cara002g026610 é o homeólogo correspondente de *C. eugenioides* e Cara001g025000 é o homeólogo correspondente de *C. canephora*.

Houve uma diferença no padrão de expressão de GSNOR de acordo com o homeólogo correspondente. O gene GSNOR CaCc foi reprimido em folhas e teve um aumento de expressão em raiz, em função do tratamento com Hx (figura 28). Em GSNOR CaCe o Hx reprimiu a expressão do gene em folha (figura 29A) e induziu a expressão em raiz (figura 29 B). O padrão observado na expressão do homeólogo GSNOR CaCe está de acordo com o padrão observado na emissão de NO e concentração de nitrito, sugerindo o homeólogo CaCc tem maior importância em raiz e CaCe tem maior importância em folhas para a homeostase de NO em situação de estresse.

Figura 28: Perfil transcricional de GSNOR homeólogo CaCc em folhas (A) e raízes laterais (B) de *C. arabica*. Legenda: plantas em solução nutritiva (CC), tratamento com ácido hexanoico (Hx)

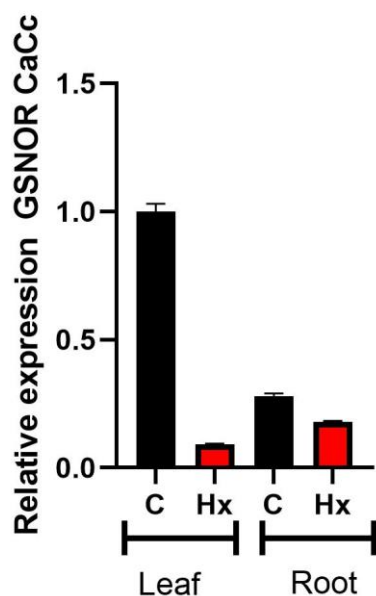
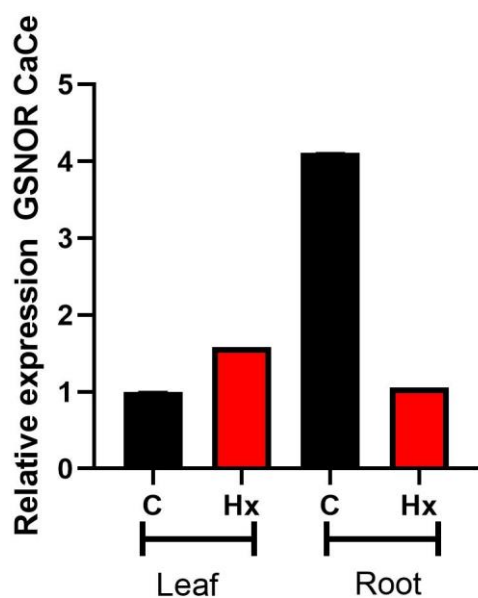


Figura 29: Perfil transcricional de GSNOR homeólogo CaCe em folhas (A) e raízes laterais (B) de *C. arabica*. Legenda: plantas em solução nutritiva (CC), tratamento com ácido hexanoico (Hx)



5. Conclusão

O ácido hexanoico modulou o estresse oxidativo em folhas maduras de *Coffea arabica*. *C. arabica* possui dois homólogos ao gene RbohD de *Arabidopsis thaliana*, que correspondem aos homeólogos de *C. canephora* (RbohD CaCc) e *C. eugenoides* (RbohD CaCe), respectivamente. O ácido hexanoico induziu a expressão de RbohD CaCc em folhas e reprimiu

a expressão de RbohD CaCe, sugerindo que o homeólogo CaCc é mais importante na geração de EROs em *C. arabica*.

O ácido hexanoico promoveu um aumento de nitrito em raízes e S-NO em folhas.

C. arabica possui dois genes codificantes de GSNOR, que correspondem aos homeólogos das espécies parentais (GSNOR CaCc e GSNOR CaCe). O ácido hexanoico induz a expressão de GSNOR CaCc em raízes e a expressão de CaCe em folhas, sugerindo que os homeólogos são diferencialmente expressos em cada tecido e ambos são importantes na modulação de níveis de NO.

Referências

- ANGELOS, Evan; BRANDIZZI, Federica. NADPH oxidase activity is required for ER stress survival in plants. **The Plant Journal**, v. 96, n. 6, p. 1106-1120, 2018.
- ARANEGA-BOU, Paz et al. Priming of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 488, 2014.
- AZEVEDO, R. A. et al. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, n. 2, p. 280-292, 1998.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CARVALHO, Kenia et al. Homeologous genes involved in mannitol synthesis reveal unequal contributions in response to abiotic stress in *Coffea arabica*. **Molecular genetics and genomics**, v. 289, n. 5, p. 951-963, 2014.
- CARVALHO, Kenia et al. Nitrogen starvation, salt and heat stress in coffee (*Coffea arabica* L.): identification and validation of new genes for qPCR normalization. **Molecular biotechnology**, v. 53, n. 3, p. 315-325, 2013.
- CHENG, Chenxia et al. Genome-wide analysis of respiratory burst oxidase homologs in grape (*Vitis vinifera* L.). **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 12, p. 24169-24186, 2013.
- CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. First *Coffea arabica* karyogram showing that this species is a true allotetraploid. **Plant Systematics and Evolution**, v. 274, n. 3-4, p. 237, 2008.
- CLARK, Ralph B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 458-460, 1975.
- CZARNOCKA, Weronika; KARPIŃSKI, Stanisław. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical*

Biology and Medicine, v. 122, p. 4-20, 2018.

DAVIS, A. et al. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 167, n. 4, p. 357-377, DEC 2011 2011.

DE CARVALHO, K. et al. Homeologous genes involved in mannitol synthesis reveal unequal contributions in response to abiotic stress in *Coffea arabica*. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 289, n. 5, p. 951-963, OCT 2014 2014.

GAY, Craig; COLLINS, James; GEBICKI, Janusz M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylene orange complex. **Analytical biochemistry**, v. 273, n. 2, p. 149-155, 1999.

GIANNOPOLITIS, Constantine N.; RIES, Stanley K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GLOVER, Natasha M.; REDESTIG, Henning; DESSIMOZ, Christophe. Homoeologs: what are they and how do we infer them?. *Trends in plant science*, v. 21, n. 7, p. 609-621, 2016.

GOMES-JUNIOR, Rui A. et al. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, v. 65, n. 8, p. 1330-1337, 2006.

JAHNOVÁ, Jana; LUHOVÁ, Lenka; PETŘIVALSKÝ, Marek. S-Nitrosoglutathione Reductase—The Master Regulator of Protein S-Nitrosation in Plant NO Signaling. *Plants*, v. 8, n. 2, p. 48, 2019.

KOVACS, Izabella et al. ROS-Mediated Inhibition of S-nitroso glutathione Reductase Contributes to the Activation of Anti-oxidative Mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

KRAUS, Trevor E.; MCKERSIE, Bryan D.; FLETCHER, R. Austin. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 570-576, 1995.

KUBIENOVÁ, L.; Kopečný, D.; Tylichová, M.; Briozzo, P.; Skopalová, J.; Šebela, M.; Navrátil, M.; Tâche, R.; Luhová, L.; Barroso, J.B.; et al. Structural and functional characterization of a plant S-nitrosoglutathione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie* 2013, 95, 889–902.

LETERRIER, Marina et al. Function of S-nitroso glutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 6, p. 789-793, 2011.

LEYVA, M. O. et al. Preventive and post-infection control of *Botrytis cinerea* in tomato plants by hexanoic acid. **Plant pathology**, v. 57, n. 6, p. 1038-1046, 2008.

LIANG, Zhikai; SCHNABLE, James C. Functional divergence between subgenomes and gene pairs after whole genome duplications. *Molecular plant*, v. 11, n. 3, p. 388-397, 2018.

LINDERMAYR, Christian. Crosstalk between reactive oxygen species and nitric oxide in plants: key role of S-nitrosogluthathione reductase. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 122, p. 110-115, 2018.

LIU, L.; Hausladen, A.; Zeng, M.; Que, L.; Heitman, J.; Stamler, J.S. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* 2001, 410, 490–494.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LIU, H. B. et al. NADPH oxidase RBOHD contributes to autophagy and hypersensitive cell death during the plant defense response in *Arabidopsis thaliana*. *Biologia plantarum*, v. 59, n. 3, p. 570-580, 2015.

LIU, Limin et al. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature*, v. 410, n. 6827, p. 490, 2001.

LLOYD, Andrew et al. Homoeologous exchanges cause extensive dosage-dependent gene expression changes in an allopolyploid crop. *New Phytologist*, v. 217, n. 1, p. 367-377, 2018.

MARINO, Daniel et al. A burst of plant NADPH oxidases. *Trends in plant science*, v. 17, n. 1, p. 9-15, 2012.

MILLER, Gad et al. The plant NADPH oxidase RbohD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci. Signal.*, v. 2, n. 84, p. ra45-ra45, 2009

MITTLER, Ron. ROS are good. *Trends in Plant Science*, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.

NAKANO, Yoshiyuki; ASADA, Kozi. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NISHIKIMI, Morimitsu; RAO, N. Appaji; YAGI, Kunio. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 46, n. 2, p. 849-854, 1972.

NOIROT, Elodie et al. Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogein. *Journal of experimental botany*, v. 65, n. 17, p. 5011-5022, 2014.

OLIVEIRA, Halley C. et al. Nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles alleviate the effects of salt stress in maize plants. *Nitric Oxide*, v. 61, p. 10-19, 2016.

PETITOT, Anne-Sophie; LECOULS, Anne-Claire; FERNANDEZ, Diana. Sub-genomic origin and regulation patterns of a duplicated WRKY gene in the allotetraploid species *Coffea arabica*. *Tree Genetics & Genomes*, v. 4, n. 3, p. 379-390, 2008.

PERROIS, Charlène et al. Differential regulation of caffeine metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta). *Planta*, v. 241, n. 1, p. 179-191, 2015.

RASUL, Sumaira et al. Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered

immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, cell & environment**, v. 35, n. 8, p. 1483-1499, 2012.

SAVVIDES, Andreas et al. Chemical priming of plants against multiple abiotic stresses: mission possible?. **Trends in plant science**, v. 21, n. 4, p. 329-340, 2016.

SILVEIRA, Neidiquele M. et al. Encapsulation of S-nitrosoglutathione into chitosan nanoparticles improves drought tolerance of sugarcane plants. **Nitric Oxide**, v. 84, p. 38-44, 2019.

STAAB, Claudia A. et al. The Janus face of alcohol dehydrogenase 3. **Chemico-biological interactions**, v. 178, n. 1-3, p. 29-35, 2009.

VAN BREUSEGEM, Frank; FOYER, Christine; MANN, Giovanni. Reactive oxygen species are crucial “pro-life “survival signals in plants. 2018.

XIE, Yan-Jie et al. Evidence of *Arabidopsis* salt acclimation induced by up-regulation of HY1 and the regulatory role of RbohD-derived reactive oxygen species synthesis. **The Plant Journal**, v. 66, n. 2, p. 280-292, 2011.

XIE, Yan-Jie et al. Evidence of *Arabidopsis* salt acclimation induced by up-regulation of HY1 and the regulatory role of RbohD-derived reactive oxygen species synthesis. **The Plant Journal**, v. 66, n. 2, p. 280-292, 2011.

YAO, Yuan et al. ETHYLENE RESPONSE FACTOR 74 (ERF74) plays an essential role in controlling a respiratory burst oxidase homolog D (RbohD)-dependent mechanism in response to different stresses in *Arabidopsis*. **New Phytologist**, v. 213, n. 4, p. 1667-1681, 2017.

ZHANG, Xin et al. Interfering with nitric oxide measurements 4, 5-diaminofluorescein reacts with dehydroascorbic acid and ascorbic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 50, p. 48472-48478, 2002.

ZHANG, Gengyun et al. Genome sequence of foxtail millet (*Setaria italica*) provides insights into grass evolution and biofuel potential. **Nature biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 549-554, 2012.

Considerações Finais

Ao longo da evolução de plantas superiores, os dados sugerem que houve uma perda de genes GSNOR, já que em espécies basais encontramos famílias gênicas com 2 genes para GSNOR, enquanto que na maioria das espécies eudicotiledôneas e monocotiledôneas encontramos apenas um gene, com exceção às espécies poliploides e de duplicação espécie-específica.

A família gênica da Rboh é formada por 10 membros em *A. thaliana*. Verificamos que os parálogos RbohC e RbohG são exclusivos de *A. thaliana*. Em monocotiledôneas encontramos apenas os homólogos RbohB, Rboh D, RbohE e RbohI.

O ácido exanoico induziu a expressão de RbohD CaCc em folhas e reprimiu a expressão de RbohD CaCe, sugerindo que o homeólogo CaCc é mais importante na geração de EROs em *C. arabica*.

O ácido hexanoico promoveu um aumento de nitrito em raízes e S-NO em folhas.

O ácido hexanoico induz a expressão de GSNOR CaCc em raízes e a expressão de CaCe em folhas, sugerindo que os homeólogos são diferencialmente expressos em cada tecido e ambos são importantes na modulação de níveis de NO.

—