

DENISE FERNANDES

SILENCIAMENTO DO GENE DA *MIO-INOSITOL-FOSFATO SINTASE* E SUA INFLUÊNCIA NA MORFO-FISIOLOGIA E NO PERFIL METABÓLICO PRIMÁRIO E DE PAREDE CELULAR EM TOMATEIRO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F363s
2014

Fernandes, Denise, 1982-
Silenciamento do gene da *mio*-inositol-fosfato sintase e sua influência na morfo-fisiologia e no perfil metabólico primário e de parede celular em tomateiro / Denise Fernandes. - Viçosa, MG, 2014.
xii, 185f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Inclui apêndice.

Orientador : Wagner Campos Otoni.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Tomate - Melhoramento genético. 2. Moneymaker.
3. Desenvolvimento de sementes. 4. *Mio*-inositol-fosfato sintase. 5. Silenciamento. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 635.642

DENISE FERNANDES

**SILENCIAMENTO DO GENE DA *MIO*-INOSITOL-FOSFATO
SINTASE E SUA INFLUÊNCIA NA MORFO-FISIOLOGIA E NO
PERFIL METABÓLICO PRIMÁRIO E DE PAREDE CELULAR EM
TOMATEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2014.

Luciano Gomes Fietto

Wagner Luiz Araújo

Francisco José Lima Aragão

Adriano Nunes Nesi
(Coorientador)

Wagner Campos Otoni
(Orientador)

A Deus ao meu anjo da guarda e minha família

Ana, Adão, Cristiano e Leonardo.

Pelo amor, compreensão e apoio

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus por todas as bênçãos, acima de tudo à da vida e à fé.

A toda minha família, Ana, Adão, Cristiano e Leonardo, em especial à minha mãe Ana Maria.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade da realização do curso em nível de doutorado em Fisiologia Vegetal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudos na Universidade Federal de Viçosa (UFV) e estágio sandwich no Instituto Max Planck (MPI).

Ao orientador Wagner Campos Otoni, que serei eternamente grata pela orientação, compreensão, oportunidades e possibilitar meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos II - LCTII do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela infraestrutura oferecida para viabilização deste trabalho.

Ao prof. Francisco José Lima de Aragão pela coorientação e disponibilidade da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia no Laboratório de Expressão de Genes

Ao professor Adriano Nunes Nesi pela coorientação e disponibilidade do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e encaminhamento ao MPI.

Ao professor Alisdair R. Fernie pelo acolhimento no Laboratório de Metabolismo Central no MPI.

À professora Poliane Alfenas-Zerbini pela coorientação e disponibilidade do Laboratório de Virologia Molecular de Plantas, Bioagro – UFV.

À professora Valéria Monteze Guimarães pela disponibilidade do Laboratório de Tecnologia Bioquímica, Bioagro – UFV.

Ao professor Rolf Puschmann pela disponibilidade do Laboratório de Fisiologia Pós-Colheita.

À professora Nilda de Fátima Ferreira Soares pela disponibilidade do Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos-LABEM/DTA.

Ao professor Lyderson Facio Viccini da Universidade Federal de Juiz de Fora pela realização das análises de citometria de fluxo.

Aos colegas e amigos de laboratório Cleber, Diego, Ana Cláudia, Débora, Renan, Marcelo, Élcio, Caroline que se fizeram presentes durante as pesquisas e, de alguma ou várias maneiras, tem crédito nesse trabalho. A todos os colegas do BIOAGRO por todos esses anos de convivência e amizade.

Aos novos amigos da Alemanha (Instituto Max Planck) em especial ao Saleh com a valiosa orientação nos processos de extração e análise de dados da metabolômica. À técnica Norma Funke que gentilmente ensinou os processos de extração de metabólitos da parede celular e análise de dados.

Aos amigos que fizeram a passagem na Alemanha algo memorável: Ana María Espinosa e seu marido Rodrigo Canto, Julia Smirnova, Igor Flóres, Saleh Alseekh, Tamar Avin Wittenberg, Ilse Balbo, Xurxo Fernández, Asdrubal Burgos, Pedro Malatesta, Fabiano Carreiro, Danilo Daloso, Brother Simion e família pelo constante carinho e cuidados para meu bem estar naquele país.

Ao amigo Marcelo Francisco Pompelli que acreditou em meu potencial iniciando-me na vida acadêmica através da iniciação científica nos tempos saudosos da UNOESC – Videira - SC.

Aos amigos e ex-chefes Leandro Crestani, Osmar Crestani, Marco Antônio Dalbó, Luiz Sérgio Scartazzini pelas orientações, ensinamentos, trabalhos, conselhos e pela contínua amizade.

Aos amigos Edgar Alves e Edna Alves pelo acolhimento em sua família, evangelização e crescimento espiritual.

A todos os amigos da Comunidade Presbiteriana de Viçosa.

As “meninas bola” Fernanda, Katheryne, Katryne e Vanessa pelos diversos momentos de companheirismo e fé.

As amigas Rafaela, Gisele e Rúbia e aos meninos Fernando (Nandinho), Giovane, Rodrigo (Gansão) pela companhia e momentos de descontração.

A todos que passaram em minha vida, durante esta fase do curso de doutorado ou mais, saibam que de alguma maneira me ajudaram a chegar até aqui! Seja por proporcionar uma feliz convivência ou por grandes aprendizados, a todos vocês, meu Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

Denise Fernandes nasceu em Caçador Santa Catarina em 19.12.1982, filha de Ana Maria Pirolli e Adão Fernandes.

Graduou-se como Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina no ano de 2006.

Concluiu o curso de mestrado em 2009 na Universidade Federal de Viçosa pelo programa de pós-graduação em Fisiologia Vegetal, orientada pelo Prof. Wagner Campos Otoni, na linha de pesquisa ‘morfogênese *in vitro* e transformação genética de plantas’, em parceria com a Embrapa – Biotecnologia e Recursos Genéticos/Cenargen e sob coorientação do Prof. José Francisco Lima de Aragão.

Iniciou o curso de doutorado em 2009 na Universidade Federal de Viçosa pelo programa de pós-graduação em Fisiologia Vegetal, orientada pelo Prof. Wagner Campos Otoni, na linha de pesquisa ‘Morfogênese *in vitro* e transformação genética de plantas’, em parceria com a Embrapa-Cenargen e Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie (MPI-MP) Golm - Alemanha.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	- 1 -
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 5 -
CAPÍTULO 1	- 8 -
O silenciamento do gene da <i>mio</i> -inositol-fosfato sintase (<i>MIPSI</i>) mediado por RNAi influencia o acúmulo de ácido fítico, o desenvolvimento e a germinação de sementes de tomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.)	- 8 -
1.1 INTRODUÇÃO.....	- 9 -
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	- 12 -
1.2.1 Curva de letalidade de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de tomateiro <i>Solanum lycopersicum</i> ao antibiótico higromicina	- 12 -
1.2.2 Transformação genética de tomateiro mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	- 12 -
1.2.3 Análise histoquímica de Gus, PCR e quantificação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo	- 14 -
1.2.5 Quantificação de pigmentos fotossintéticos de plantas transgênicas de tomateiro	- 15 -
1.2.6 Análises físicas em frutos e quantificação de ácido fítico em sementes de plantas transgênicas e plantas-controle de tomateiro.....	- 16 -
1.2.7 Análise da expressão gênica por reação de polimerase em cadeia em transcrição reversa (RT-PCR)	- 16 -
1.2.9 Quantificação de açúcares em sementes por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)	- 17 -
1.2.10 Teste de germinação, vigor germinativo e desenvolvimento de plântulas.....	- 17 -
1.2.11 Análise dos dados	- 18 -
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	- 19 -
1.3.1 Dosagem de seleção ao antibiótico higromicina em explantes de tomateiro <i>Solanum lycopersicum</i>	- 19 -
1.3.2 Teste histoquímico de GUS	- 21 -
1.3.3 Análise de PCR e citometria de fluxo.....	- 23 -
1.3.5 Quantificação de pigmentos fotossintéticos.....	- 24 -
1.3.6 Análises físicas em frutos e quantificação de ácido fítico	- 25 -
1.3.7 Análise da expressão gênica em sementes.....	- 30 -
1.3.9 Identificação e quantificação de açúcares.....	- 31 -
1.3.10 Teste de germinação, vigor germinativo e desenvolvimento de plântulas.....	- 35 -
1.4 CONCLUSÕES	- 37 -
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 38 -
CAPÍTULO 2	- 47 -
O silenciamento do gene da <i>mio</i> -inositol-fostato sintase (<i>MIPSI</i>) mediado por RNAi em tomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.) influencia o acúmulo de ácido fítico, de açúcares, o desenvolvimento de frutos, a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas	- 47 -
2.1 INTRODUÇÃO.....	- 48 -
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	- 51 -
2.2.1 Obtenção de material vegetal.....	- 51 -
2.2.2 Confirmação da integração do transgene por reação da polimerase em cadeia (PCR)	- 52 -
2.2.3 Desenho e teste dos oligonucleotídeos para realização da PCR quantitativa de transcrição reversa (RT-qPCR)	- 53 -
2.2.4 Análise da expressão do gene <i>MIPSI</i> por qRT-PCR.....	- 53 -
2.2.5 Quantificação de pigmentos fotossintéticos.....	- 54 -
2.2.6 Resistência da epiderme à perfuração, firmeza de polpa, cor e sólidos solúveis totais.....	- 54 -
2.2.8 Análises físicas em frutos e quantificação de ácido fítico em sementes de plantas-controle e linhagens transgênicas silenciadas para <i>MIPSI</i>	- 55 -
2.2.10 Identificação e quantificação de oligossacarídeos em sementes e folhas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).....	- 56 -
2.2.11 Teste de germinação e desenvolvimento de plântulas.....	- 56 -
2.2.12 Delineamento experimental e análise dos dados.....	- 57 -
2.3 RESULTADOS.....	- 58 -
2.3.1 Análise de PCR e expressão de <i>MIPSI</i> por RT-qPCR em plantas T ₁	- 58 -
2.3.3 Quantificação de pigmentos fotossintéticos.....	- 59 -

2.3.4 Resistência da epiderme à perfuração, firmeza de polpa, cor, sólidos solúveis totais, análises físicas de frutos e quantificação de ácido fítico.....	- 59 -
2.3.5 Quantificação de açúcares em folhas e sementes.....	- 61 -
2.3.6 Teste de germinação e desenvolvimento de plântulas.	- 62 -
2.4 DISCUSSÃO.....	- 63 -
2.5 CONCLUSÕES.....	- 69 -
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 70 -
CAPÍTULO 3.....	- 81 -
Perfil metabólico primário de pericarpo e sementes durante o desenvolvimento de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> silenciadas para a <i>mio</i> -inositol-fosfato sintase (<i>MIPSI</i>).....	- 81 -
3.1 INTRODUÇÃO.....	- 82 -
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	- 84 -
3.2.1 Material vegetal e condições experimentais	- 84 -
3.2.2 Confirmação da integração do transgene por reação da polimerase em cadeia (PCR)	- 85 -
3.2.3 Desenho e teste dos oligonucleotídeos para realização da PCR quantitativa de transcrição reversa (RT-qPCR)	- 86 -
3.2.4 Análise da expressão do gene da <i>MIPSI</i> por RT-qPCR	- 86 -
3.2.5 Análise de metabólitos primários – extração em pericarpo de frutos e sementes	- 87 -
3.2.5.1 Derivatização da fase polar de pericarpos e sementes	- 88 -
3.2.5.2 Análise de dados	- 89 -
3.2.6 Metabólitos de parede celular	- 89 -
3.2.6.1 Extração e remoção de amido	- 89 -
3.2.6.2 Hidrólise ácida para quantificação de monossacarídeos neutros	- 90 -
3.2.6.3 Açúcares neutros de parede celular.....	- 90 -
3.2.6.4 Quantificação de celulose da parede celular	- 91 -
3.2.6.5 Quantificação de ácidos urônicos.....	- 91 -
3.3 RESULTADOS.....	- 93 -
3.3.1 Confirmação da manutenção do transgene por análise de PCR em plantas T ₂ e análise do nível de expressão de <i>MIPSI</i> por RT-qPCR	- 93 -
3.3.3 Perfil metabólico de sementes de tomate em plantas da progênie T ₂ silenciada.....	- 93 -
3.3.4 Alterações metabólicas em pericarpo de frutos de plantas de tomate em linhagens <i>MIPSI</i> silenciadas.....	- 100 -
3.3.5 Açúcares neutros de parede celular.....	- 105 -
3.4 DISCUSSÃO.....	- 106 -
3.5 CONCLUSÕES.....	- 111 -
3.6 REFERÊNCIAS.....	- 112 -
CAPÍTULO 4.....	- 123 -
Silenciamento da <i>mio</i> -inositol1-fosfato sintase (<i>MIPSI</i>) incrementa o conteúdo de açúcares sem alterar o sistema enzimático antioxidante e componentes da parede celular	- 123 -
4.1 INTRODUÇÃO.....	- 124 -
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	- 127 -
4.2.1 Material vegetal e condições experimentais	- 127 -
4.2.2 Confirmação da integração do transgene por reação da polimerase em cadeia (PCR)	- 128 -
4.2.3 Desenho e teste dos oligonucleotídeos para realização da PCR quantitativa de transcrição reversa (RT-qPCR)	- 129 -
4.2.4 Análise da expressão gênica de <i>MIPSI</i> por RT-qPCR	- 129 -
4.2.5 Análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	- 130 -
4.2.6 Amostragem e extração de pigmentos fotossintéticos, sacarose, glicose, frutose, glicose-6P, amido e proteínas.....	- 131 -
4.2.7 Quantificação de pigmentos fotossintéticos.....	- 132 -
4.2.8 Quantificação de amido	- 132 -
4.2.9 Quantificação de açúcares: sacarose, glicose, frutose e glicose-6P	- 133 -
4.2.9.1 Glicose-6-Fosfato.....	- 133 -
4.2.9.2 Glicose, frutose e sacarose	- 134 -
4.2.10 Amostragem para determinação de atividade enzimática, perfil metabólico primário e monossacarídeos de parede.....	- 135 -
4.2.11 Determinação da atividade antioxidativa.....	- 135 -
4.2.11.1 Obtenção do extrato enzimático bruto	- 135 -
4.2.11.2 Determinação da atividade das superóxidos dismutases (SODs, EC 1.15.1.1).....	- 135 -
4.2.11.3 Determinação da atividade das catalases (CATs, EC 1.11.1.6).	- 136 -

4.2.11.4	Determinação da atividade das peroxidases do ascorbato (APXs, EC 1.11.1.1).....	- 136 -
4.2.11.5	Determinação da atividade das peroxidases (POXs, EC 1.11.1. 7).....	- 136 -
4.2.12	Análise de metabólitos primários.....	- 137 -
4.2.12.1	Extração de metabólitos primários de folhas	- 137 -
4.2.12.2	Derivatização da fase polar de folhas.....	- 137 -
4.2.12.3	Análise de dados.	- 138 -
4.2.13	Metabólitos de parede celular	- 138 -
4.2.13.1	Extração e remoção de amido	- 138 -
4.2.13.2	Hidrólise ácida para quantificação de monossacarídeos neutros	- 139 -
4.2.13.3	Açúcares neutros de parede celular.....	- 139 -
4.2.13.4	Quantificação de celulose da parede celular	- 139 -
4.2.13.5	Quantificação de ácidos urônicos.....	- 140 -
4.2.14	Análise estatística	- 140 -
4.3	RESULTADOS	- 141 -
4.3.1	Confirmação da manutenção do transgene por análise de PCR em plantas T ₃ e análise do nível de expressão de MIPS1 por qRT-PCR	- 141 -
4.3.2	Quantificação de pigmentos fotossintéticos.....	- 141 -
4.3.3	Quantificação de glicose-6-fosfato glicose, frutose, sacarose, amido e proteína em folhas de plantas-controle e linhagens silenciadas	- 142 -
4.3.4	Trocas gasosas	- 143 -
4.3.5	Fluorescência da clorofila <i>a</i>	- 144 -
4.3.6	Determinação da atividade antioxidativa	- 145 -
4.3.7	Análise de metabólitos primários	- 146 -
4.3.8	Açúcares de parede celular, celulose e ácidos urônicos.....	- 148 -
4.4	DISCUSSÃO	- 149 -
4.5	CONCLUSÕES	- 157 -
4.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 158 -
	CONCLUSÕES GERAIS	- 165 -
	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	- 166 -
	DADOS SUPLEMENTARES.....	- 167 -

RESUMO

FERNANDES, Denise, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Silenciamento do gene da *mio*-inositol-fosfato sintase e sua influência na morfofisiologia e no perfil metabólico primário e de parede celular em tomateiro.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Coorientadores: Adriano Nunes Nesi e Poliane Alfenas Zerbini.

A enzima *mio*-inositol-1-fosfato sintase (MIPS1) (E.C.5.5.1.4) catalisa a conversão irreversível de D-Glicose-6-P para 1-L-*mio*-inositol-1-P. O *mio*-inositol desempenha papel de destaque no metabolismo vegetal, fornecendo inositol e inosítídeos em processos metabólicos essenciais à formação do vegetal. Dentre as várias vias nas quais o *mio*-inositol está envolvido algumas são alvo do melhoramento vegetal, a exemplo a manipulação do conteúdo de ácido fítico e de oligossacarídeos em sementes e açúcares estruturais na parede celular. Até o presente momento, plantas *MIPS* silenciadas não foram caracterizadas em detalhes, principalmente em suas estruturas vegetativas. Com isso, o presente trabalho objetivou caracterizar tomateiros ‘Moneymaker’ com diferentes níveis de silenciamento de *MIPS1*. Para a indução do silenciamento utilizou-se transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* contendo plasmídeo pCambia com construção tipo *intron hairpin* de fragmentos do gene *MIPS* de *Glycine max* ($\Delta GmMIPS$) sob controle do promotor *CaMV 35S*. Avaliou-se o efeito do silenciamento de *MIPS1* em plantas transgênicas matrizes T₀ e progênes T₁ e T₂ quanto ao desenvolvimento de frutos e sementes, conteúdos de ácido fítico, açúcares, pigmentos fotossintéticos, respostas fisiológicas mediante a avaliação das trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, atividade de enzimas do estresse oxidativo e caracterização do perfil metabólico e constituintes de parede celular. Os resultados apontaram eficiência da construção transgênica na indução do silenciamento. O silenciamento ocasionou redução do conteúdo de ácido fítico em sementes, redução da quantidade de sementes por fruto e redução no desenvolvimento do fruto; redução na germinação e desenvolvimento de plântulas provindas de sementes normais nas progênes T₀ e T₁. O silenciamento também ocasionou alterações no conteúdo de açúcares, em folhas e sementes nas progênes T₀ e T₁ e reduziu a firmeza da epiderme e do pericarpo em frutos da progênie T₁. Tal redução na firmeza pode estar relacionada à composição ou estrutura das paredes celulares; porém não foram identificadas reduções no conteúdo de açúcares de parede celular e celulose em pericarpos e folhas de plantas T₂, mas sim

acúmulo de ácidos urônicos, tanto em pericarpo quanto em folhas. Em relação ao aparato fotossintético, o silenciamento não causou alterações. O conteúdo de pigmentos fotossintéticos, parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram semelhantes aos apresentados pelas plantas não transformadas. Outra evidência que o silenciamento de *MIPS* não causa distúrbios no corpo vegetativo foi a atividade de enzimas do estresse oxidativo que, em condições ótimas, não apresentou diferenças. As alterações encontradas no corpo vegetativo tiveram estreito envolvimento com o metabolismo de inositol, como conteúdo de açúcares (glicose-6P, glicose e sacarose) em horários de intensa atividade fotossintética. A metabolômica possibilitou uma análise mais integrativa em que ficou evidenciada a redução de alguns aminoácidos, acúmulo de açúcares e redução de açúcares alcoóis, todos estreitamente relacionados ao metabolismo de inositol em folhas. Em frutos, verificou-se influência mais expressiva da *MIPS*, com alterações em todas as quatro idades avaliadas (10, 15, 50 e 60 dias após a antese), tanto no pericarpo quando nas sementes. O maior número de alterações foi encontrado nas sementes, caracterizadas pela redução do conteúdo de aminoácidos, de intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), de ácidos orgânicos e de açúcares alcoóis. Os açúcares, por sua vez, apresentaram comportamento variado, dependendo da sua relação com o metabolismo de inositol, onde a frutose e a trealose apresentam acúmulo, enquanto a glicose e a sacarose apresentam padrão mais variado em decorrência do envolvimento em uma rede mais complexa de regulação. Em pericarpos, o perfil metabólico foi respondente as variações de desenvolvimento, porém apresentando alterações no conteúdo de açúcares. Com esse estudo podemos afirmar que a construção tipo *intron hairpin* de fragmentos do gene *MIPS* de *Glycine max* ($\Delta GmMIPS$), sob controle do promotor *CaMV 35S*, ocasiona silenciamento em tomateiros e as plantas silenciadas tiveram o conteúdo de metabólitos influenciados pelo conteúdo de *mio*-inositol ou expressão da *MIPS* alterado, tanto na parte vegetativa quanto na reprodutiva. Registra-se, também, que o silenciamento de *MIPS* não foi capaz de alterar a atividade fotossintética ou causar direta ou indiretamente estresse oxidativo no corpo vegetativo em plantas *MIPS* silenciadas.

ABSTRACT

FERNANDES, Denise, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2014. **Silencing of myo-inositol-phosphate synthase via RNAi in tomato and its influence on morpho-physiology of the vegetative and reproductive body, and metabolic profile of primary and cell wall.** Advisor: Wagner Campos Otoni. Co-advisors: Adriano Nunes Nesi and Poliane Alfenas Zerbini.

Myo-inositol phosphate synthase (MIPS1) (E.C.5.5.1.4) catalyzes the irreversible conversion of D-Glucose-6-P to 1-L-myo-inositol-1-P. Myo-inositol plays an important role in plant metabolism, providing inositides and inositol for essential metabolic processes in the formation of the vegetative and reproductive plant body. Among the pathways in which the myo-inositol is closely involved, some are target of plant breeding, such as genetic manipulation of phytic acid and oligosaccharides contents in seeds and structural sugars in the cell wall. To date, *MIPS* silenced plants have not been characterized in detail, especially in their vegetative structures. Thus, the present study aimed to characterize tomato 'Moneymaker' with different levels of silencing *MIPS1*. For induction of gene silencing was used transformation via *Agrobacterium tumefaciens* containing the plasmid pCambia with construct intron-hairpin-RNA type with *MIPS* gene fragments of *Glycine max* (Δ GmMIPS) under control of the *CaMV 35S*. The effect of *MIPS1* silencing in primary transgenic plants T₀ and T₁ and T₂ progenies was evaluated for the development of fruit and seeds, phytic acid and sugar contents, photosynthetic pigments, physiological responses by evaluating gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, oxidative stress enzyme activity, metabolic profile characterization and cell wall constituents. The results showed the efficiency of the transgenic construct to induce silencing. The silencing resulted in reduction of phytic acid content in seeds, reducing the amount of seeds and a reduction in fruit development, reduction in germination and seedling development stemmed from normal seeds in T₀ and T₁ progeny. The silencing also induced changes in the content of sugars in leaves and seeds in T₀ and T₁ progeny and reduced firmness of the epidermis and pericarp in fruits of T₁ progeny. This decrease in firmness may be related to the composition or structure of cell walls, but no reductions were identified in the content of sugars and cellulose in cell wall pericarp and leaves of T₂ plants, but accumulation of uronic acids, both in pericarp as sheets. In relation to the photosynthetic apparatus, silencing caused no changes. The content of photosynthetic pigments, gas exchange parameters and chlorophyll fluorescence were similar to those presented by the non-

transformed plants, Further evidence that silencing of *MIPS* does not cause disturbances in the vegetative body was the activity of enzymes of the oxidative stress that in optimal conditions, showed no differences. However, the changes found in the vegetative body had close involvement with the metabolism of inositol, as content of sugars (glucose-6P, glucose and sucrose) in times of intense photosynthetic activity. The metabolomics allowed a more integrative analysis in which there is an evident reduction of some amino acids, accumulation of sugars and sugar alcohols reduction, all closely related to the metabolism of inositol sheets. In fruits, there was more significant influence of *MIPS*, with changes in all four ages evaluated (10, 15, 50 and 60 days after anthesis), both when the seed pericarp. The largest number of changes were found in the seeds, characterized by the reduction of the content of amino acids, intermediates of the citric acid cycle (TCA), organic acids and sugar alcohols. Sugars, in turn, showed varied behavior depending on their relationship with the metabolism of inositol, where fructose and trehalose accumulation feature, while glucose and sucrose have more varied pattern as a result of being involved in a more complex regulatory network. In pericarp, the metabolic profile was respondent variations in development, but with alterations in sugar content. With this study we can see that the construction type intron hairpin fragment of *MIPS* Glycine max ($\Delta GmMIPS$) gene under control of the *CaMV 35S* promoter, causes silencing in tomato plants were silenced and content of metabolites influenced the content of myo-inositol or altered expression of *MIPS*, both in vegetative and in reproductive part. Join also the silencing of *MIPS* was not able to change the photosynthetic activity or directly or indirectly cause oxidative stress in the vegetative body *MIPS*-silenced plants.

INTRODUÇÃO GERAL

O *mio*-inositol é um componente essencial na biossíntese de uma variedade de derivados que vão desde simples fosfatos de inositol até complexos produtos associados à membrana com funções celulares importantes (Dong *et al.*, 2013). A enzima sintase do *mio*-inositol-1-fosfato (*MIPSI*) (E.C.5.5.1.4) catalisa a conversão irreversível de D-Glicose-6-P para 1-L-*mio*-inositol-1-P [*Ins*(3)P]. Essa é a única via de biossíntese *de novo*, sendo encontrada em cianobactérias, algas, fungos e plantas e possui papel central no metabolismo celular (Loewus e Loewus, 1983; Morre *et al.*, 1990; Majumder, 1997). O *mio*-inositol (*Ins*) é um importante metabólito celular, necessário para o crescimento e desenvolvimento de vegetais (Valluru e Ende, 2011; Latrasse *et al.*, 2013).

Em plantas, *Ins*(3)P desempenha papel de destaque no metabolismo do inositol, fornecendo inositol e inositídeos envolvidos em processos metabólicos e em estruturas vegetativas (Goya *et al.*, 2011). O *Ins*(3)P pode ser usado para produzir ceramidas, conjugados com hormônio AIA, inositóis metilados ligados a respostas ao estresse abiótico, polissacarídeos de parede celular, galactinol, rafinose, família oligossacarídeos, fosfatidilinositol (*PtdIns*), polifosfatos de inositol e ácido fítico (Raboy 2009) (Figura 1).

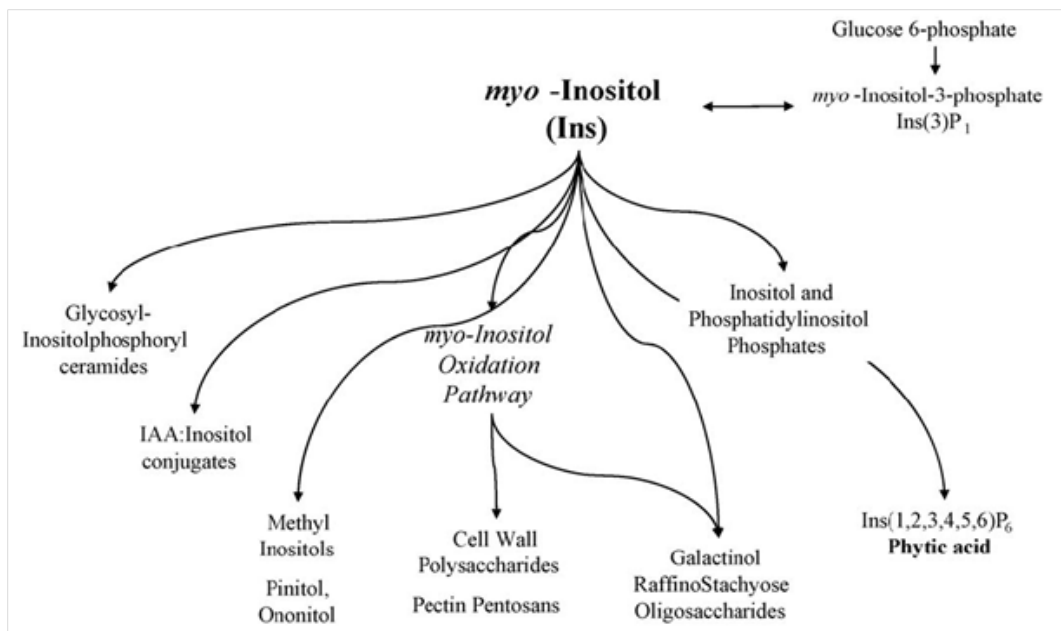


Figura 1. Rotas de biossíntese que utilizam o *mio*-inositol-3-fosfato [*Ins*(3)P] em vegetais (Raboy 2009).

Esses compostos derivados de *Ins*(3)P participam de funções celulares cruciais em plantas, como na transdução de sinais (Xue *et al.*, 2007), transporte de membranas

(Thole e Nielsen, 2008), exportação de mRNA (Okada e Ye, 2009), tolerância a estresse (Shevelava *et al.*, 1997) e armazenamento de fósforo (Thole e Nielsen, 2008; Murphy *et al.*, 2008). Além disso, o Ins(3)P é produto primário do ácido D-glucurônico, utilizado na síntese de substâncias pécticas da parede celular, compostos não celulósicos e ácido ascórbico (Loewus e Murthy, 2000; Lorence *et al.*, 2004).

Dentre as vias nas quais o *mio*-inositol está estreitamente envolvido, algumas são alvo do melhoramento vegetal, dentre elas: a manipulação do conteúdo de ácido fítico em sementes (Raboy, 2000; Brinch-Pedersen *et al.*, 2002; Ali *et al.*; 2013), de oligossacarídeos de rafinose em sementes (Raboy, 2007) e de açúcares estruturais na parede celular (Carroll e Somerville, 2009)

Até o presente momento, órgãos vegetativos e o desenvolvimento de frutos carnosos em plantas com baixa expressão de *MIPSI* não foram caracterizados em detalhes. Os esforços das pesquisas têm focado no conteúdo de moléculas alvo, como fitatos e oligossacarídeos em sementes, porém salienta-se a necessidade de estudos em órgãos vegetativos (Nunes *et al.*, 2006; Fernandes, 2009, Donahue *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2013). Tomate (*Solanum lycopersicum*) é a principal planta modelo para o estudo do desenvolvimento de frutos carnosos e amadurecimento de frutas climatéricas (Carrari *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010) assim como modelo de plantas dicotiledôneas.

A sequência da enzima *MIPS* foi descrita em mais de 70 organismos diferentes; nesses verificou-se que o domínio catalítico é conservado evolutivamente entre as espécies (Abreu e Aragão 2007) e entre os filos (Wongkaew *et al.*, 2010). Até o momento não foi descrita e caracterizada a *MIPSI* em tomateiros. Mutantes nulos da *MIPS* são letais, dessa forma, as vias biossintéticas influenciadas pelo *mio*-inositol, produto da *MIPS*, necessitam de outras abordagens de estudo.

O silenciamento de RNA regula a expressão gênica de forma pós-transcricional por meio da degradação sequência-específica de mRNAs alvo, diminuindo ou bloqueando a sua tradução. A elevada similariedade entre as sequencias de *MIPS* em diferentes espécies possibilita a construção e utilização de fragmentos do gene *MIPS* de espécies já caracterizadas para a indução do silenciamento em outras. Nesse trabalho o silenciamento foi induzido em tomateiros com a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* contendo plasmídeo pKambia com construção tipo *intron-hairpin-RNA* de fragmentos do gene *MIPS* de *Glycine max* ($\Delta GmMIPS$) sob controle do promotor *CaMV 35S*.

A baixa expressão da sintase do *mio*-inositol fosfato, ao reduzir o conteúdo de *mio*-inositol, teoricamente, pode interferir nas vias de biossíntese de ácido fítico, oligossacarídeos e compostos pécnicos. No entanto, níveis mais elevados de silenciamento podem comprometer a homeostase e manutenção de processos fisiológicos e reprodutivos resultando em alterações não esperadas e desvantajosas nas plantas silenciadas (Keller *et al.*, 1998; Nunes *et al.*, 2006; Fernandes, 2009; Donahue *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2013).

A técnica de identificação e comparação do perfil metabólico fornece uma abordagem abrangente dos metabólitos presentes em sistemas biológicos. Essa técnica tem como objetivo a extração, detecção, identificação e quantificação de um amplo espectro de compostos numa única amostra, o que proporciona uma análise mais integrativa sobre sistemas biológicos complexos (Fiehn *et al.*, 2000).

Além disso, a metabolômica tem sido utilizada como ferramenta adicional para a avaliação do metabolismo de plantas geneticamente modificadas devido ao seu potencial para detectar fenótipos silenciados e efeitos pleiotrópicos (Kuiper *et al.*, 2003). Em contraste com a transcriptômica e proteômica, a metabolômica é independente do sequenciamento de genes ou do genoma da espécie em estudo (Stitt e Fernie, 2003), e uma de suas vantagens é identificar as alterações secundárias decorrentes de determinada manipulação (Fernie *et al.*, 2004).

Com isso, o presente trabalho verificou a eficiência da utilização da sequência em construção *intron-hairpin-RNA* com fragmentos de *MIPS1* de soja *GmMIPS1* na indução do silenciamento em plantas transgênicas de tomateiro ‘Moneymaker’ e avaliou os efeitos da baixa expressão de *MIPS1* em plantas transgênicas matrizes T₀ (capítulo 1) em relação ao desenvolvimento de sementes e frutos, conteúdos de ácido fítico e açúcares em sementes e folhas. Em plantas da progênie diploide T₁ (capítulo 2) cinco linhas com diferentes níveis de redução da expressão *MIPS* foram avaliadas quanto o conteúdo de substâncias estreitamente relacionadas ao metabolismo de *mio*-inositol e parâmetros morfológicos em sementes e frutos. Na progênie T₂ seis linhas foram avaliadas em frutos e sementes (capítulo 3) quanto ao perfil metabólico primário em frutos e sementes de quatro idades após a antese e constituintes de parede celular em pericarpo de frutos maduros. Essas linhagens T₂ também tiveram o corpo vegetativo avaliado (capítulo 4) quanto ao conteúdo de pigmentos fotossintéticos, açúcares e respostas fisiológicas, avaliadas através das trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*

e atividade de enzimas do estresse oxidativo em folhas, perfil metabólico primário e de parede celular.

Essa abordagem apontou as alterações na abundância de metabólitos em frutos, sementes e folhas, decorrentes do silenciamento da *mio*-inositol-fosfato sintase ou pelo conteúdo de *mio*-inositol e comprovou a estabilidade do potencial fotossintético e enzimas do estresse oxidativo em plantas com redução da expressão da *MIPSI*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abid G, Silue S, Muhovski Y, Jacquemin JM, Toussaint A, Baudoin JP. 2009. Role of myo-inositol phosphate synthase and sucrose synthase genes in plant seed development. *Gene* 439:1–10.

Ali N, Paul S, Gayen D, Sarkar SN, Datta SK, Datta K. 2013. RNAi mediated down regulation of myo-inositol-3-phosphate synthase to generate low phytate rice. *Rice* 6:1-12.

Bilyeu KD, Zeng P, Coello P, Zhang ZJ, Krishnan HB, Bailey A, Beuselinck PR, Polacco JC. 2008. Quantitative conversion of phytate to inorganic phosphorus in soybean seeds expressing a bacterial phytase. *Plant Physiology* 146:468–477.

Brinch-Pedersen H, Sørensen LD, Holm PB. 2002. Engineering crop plants: getting a handle on phosphate. *Trends in Plant Science* 7:118-125.

Campion B, Sparvoli F, Doria E, Tagliabue G, Galasso I, Fileppi M, Bollini R, Nielsen E. 2009. Isolation and characterisation of an lpa (low phytic acid) mutant in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 18:1211–1221.

Carroll A, Somerville C. 2009. Cellulosic biofuels. *Annual Review of Plant Biology* 60:165–182.

Chiera JM, Finer JJ, Grabau EA. 2004. Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of *Glycine max* to improve phosphorus availability. *Plant Molecular Biology* 56:895–904

Donahue JL, Alford SR, Torabinejad J, Kerwin RE, Nourbakhsh A, Ray WK, Hernick M, Huang XY, Lyons BM, Hein PP. 2010. The Arabidopsis thaliana Myo-Inositol 1-Phosphate Synthase1 gene is required for myo-inositol synthesis and suppression of cell death. *Plant Cell* 22:888–903.

Dong J, Yan W, Bock C, Nokhrina K, Keller W, Georges F. 2013. Perturbing the metabolic dynamics of myo-inositol in developing *Brassica napus* seeds through in vivo methylation impacts its utilization as phytate precursor and affects downstream metabolic pathways. *Bio Med Central Plant Biology* 13:84-91

Fernandes D. 2009. Morfogênese *in vitro* em tomateiro e berinjela e silenciamento gênico da sintase do mio-inositol-fosfato por RNAi em tomateiro. Dissertação em Fisiologia Vegetal de Magister Scientiae. Universidade Federal de Viçosa. 89 p.

Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, Willmitzer L. 2004. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5:763–769

Goyoaga C, Burbano C, Cuadrado C, Romero C, Guillamón E, Varela A, Pedrosa MM, Muzquiz M. 2011. Content and distribution of protein, sugars and inositol phosphates during the germination and seedling growth of two cultivars of *Vicia faba*. *Journal of Food Composition and Analysis* 24:391–397.

- Keller R, Brearley CA, Trethewey RN, Muller-Rober B. 1998. Reduced inositol content and altered morphology in transgenic potato plants inhibited for 1D-myo-inositol 3-phosphate synthase. *Plant Journal* 16:403–410
- Kersting MC, Boyette M, Massey J, Ryals PE. 2003. Identification of the inositol isomers present in Tetrahymena. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 50: 164–168
- Larson SR, Young KA, Cook A, Blake TK, Raboy V. 1998. 614 Linkage mapping of two mutations that reduce phytic acid 615 content of barley grain. *Theoretical and Applied Genetics* 97:141–146.
- Larson SR, Rutger JN, Young KA, Raboy V. 2000. Isolation and 617 genetic mapping of a non-lethal rice (*Oryza sativa* L.) low 618 phytic acid 1 mutation. *Crop Science* 40:1397–1405.
- Latrasse D, Jégou T, Meng P, Mazubert C, Hudik E, Delarue M, Charon C, Crespi M, Hirt H, Raynaud C, Bergounioux C, Benhamed M. 2013. Dual function of MIPS1 as a metabolic enzyme and transcriptional regulator. *Nucleic Acids Research* 41:2907-2917.
- Loewus FA, Loewus MW. 1983. *myo*-Inositol: its biosynthesis and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* 34:137-161.
- Loewus FA, Murthy PPN. 2000. *myo*-Inositol metabolism in plants. *Plant Science* 150:1–19.
- Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL. 2004. Myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology* 134:1200–1205.
- Majumder AL, Johnson MD, Henry SA. 1997. 1L-myoInositol-1-phosphate synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1348:245–25.
- Morré DJ, Boss WF, Loewus FA. 1990. *Inositol Metabolism in Plants*. (Eds.) Wiley–Liss, New York, p 393.
- Murphy AM, Otto B, Brearley CA, Carr JP, Hanke DE. 2008. A role for inositol hexakisphosphate in the maintenance of basal resistance to plant pathogens. *Plant Journal* 56:638–652.
- Nunes A, Vianna G, Cuneo F, Amaya-Farfán J, Capdeville G, Rech E, Aragão F. 2006. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPS1*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta* 224:125-132.
- Okada M, Ye K. 2009. Nuclear phosphoinositide signaling regulates messenger RNA export. *RNA Biology* 6:12–16.
- Raboy V. 2000. Genetics and breeding of seed phosphorus and phytic acid. *Journal of Plant Physiology* 158:489–494

Raboy V. 2006. Seed phosphorus and the development of low-phytate crops, in: Turner BL, Richardson AE, Mullaney EJ. (Eds.) *Inositol Phosphates: Linking Agriculture and Environment*, CAB International, Oxfordshire, UK, p. 111–132.

Sato T, Atomi H. 2011. Novel metabolic pathways in Archaea. *Ecology and Industrial Microbiology / Special section: Archaea* 14: 307–314

Schauer N, Semel Y, Roessner U, Gur A, Balbo I, Carrari F, Pleban T, Perez-Melis A, Bruedigam C, Kopka J, Willmitzer L, Zamir D, Fernie AR. 2006. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of intraspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology* 24:447–454

Sheveleva E, Chmara W, Bohnert HJ, Jensen RG. 1997. Increased salt and drought tolerance by d-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiology* 115:1211–1219.

Shi J, Wang H, Wu Y, Hazebroek J, Meeley RB, Ertl DS. 2003. The maize low-phytic acid mutant *lpa2* is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gene. *Plant Physiology* 131:507–515

Shi J, Wang H, Schellin K, Li B, Faller M, Stoop JM, Meeley RB, Ertl DS, Ranch JP, Glassman K. 2007. Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. *Nature Biotechnology* 25:930–937

Stitt M, Fernie AR. 2003. From measurements of metabolites to metabolomics: an ‘on the fly’ perspective illustrated by recent studies of carbon–nitrogen interactions. *Current Opinion in Biotechnology* 14:136–144

Thole JM, Nielsen E. 2008. Phosphoinositides in plants: novel functions in membrane trafficking. *Current Opinion in Plant Biology* 11:620-631.

Valluru R, Ende WV. 2011. Myo-inositol and beyond- emerging networks under stress. *Plant Science* 18:387-400.

Wilcox J, Premachandra G, Yound K, Raboy V. 2000. Isolation of 678 high seed inorganic P, low-phytate soybean mutants. *Crop Science* 40:1601–1605

Xue H, Chen X, Li G. 2007. Involvement of phospholipid signaling in plant growth and hormone effects. *Current Opinion in Plant Biology* 10:483–489.

Zerbini FM, Alfenas PF, Andrade EC. 2005. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus. *RAPP* 13:191-217.

CAPÍTULO 1

O silenciamento do gene da *mio*-inositol-fosfato sintase (MIPS1) mediado por RNAi influencia o acúmulo de ácido fítico, o desenvolvimento e a germinação de sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* Mill.).

1.1 INTRODUÇÃO

A molécula de *mio*-inositol exerce papel multifuncional na bioquímica e na fisiologia vegetal. Sua biossíntese se dá pela conversão irreversível de D-Glicose-6-P para 1-L-*mio*-inositol-1-P [Ins(3)P], que após a retirada do grupamento fosfato, libera a molécula de *mio*-inositol (Ins). A síntese de 1-L-*mio*-inositol-1-P é realizada pela *mio*-inositol-1-fosfato sintase (E.C.5.5.1.4). Essa enzima está presente em todos os eucariotos e se apresenta altamente conservada e é a única via de biossíntese de Ins(3)P em cianobactérias, algas, fungos e plantas, ocupando papel central no metabolismo celular (Loewus e Loewus, 1983; Morré *et al.*, 1990; Majumder, 1997).

O Ins livre é necessário para formar galactinol e galactosil necessários na biossíntese de oligossacarídeos de rafinose (OR); galactopinitol e série de oligossacarídeos; isômeros de inositol: silo-, chiro-, muco-, e neo-; inositois metilados O-metil inositois: sesquitol, bornesitol, quebrachitol, pinitol, ononitol, os quais participam em respostas relacionadas ao estresse e armazenamento em sementes; inositol-glicosídeos como pinitol-galactosídeos, biossíntese de ácido fítico (IP₆) e ácido fítico pirofosfatado (Horbowicz e Obendorf, 1994; Peterbauer e Richter, 1998; Brearley e Hanke, 1996).

Algumas das moléculas em que o inositol é requerido são foco de melhoramento vegetal, como o fator antinutricional fitato, e os indigestíveis oligossacarídeos de rafinose. A diminuição do conteúdo de ácido fítico em sementes pode fornecer maiores quantidades de fósforo livre, carboidratos e cátions divalentes como Fe²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ e Ca²⁺, os quais são quelados pelo ácido fítico, assim indisponibilizados na dieta alimentar. A diminuição do fitato também contribui na redução de impactos ambientais como poluição da água e eutrofização de rios devida à carga excessiva de fósforo liberada em dejetos agroindustriais que contêm sementes como matéria-prima (Raboy, 2000; Lott *et al.*, 2000; Brinch-Pedersen *et al.*, 2002).

Os oligossacarídeos, por sua vez, estão ligados à flatulência intestinal e estão associados com cólicas, diarreia, dispepsia e constipação devido à inabilidade humana e de animais monogástricos em digerir os oligossacarídeos de rafinose, em especial a estaquiose e a rafinose (Wagner *et al.*, 1976; de Lumen, 1992). A redução dos oligossacarídeos poderia diminuir os efeitos indesejados relacionados ao seu consumo, a redução da biossíntese pode estar relacionada à molécula de *mio*-inositol, necessária na

biossíntese de galactinol, substrato da via de oligossacarídeos de rafinose (Loewus e Murthy, 2000).

O ácido fítico (AF) ou inositol 1,2,3,4,5,6-hexafosfato ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) (IP6) encontra-se amplamente distribuído nos vegetais e é estocado em sementes como principal forma de armazenamento de fósforo, correspondendo de 60 a 95% do total de fósforo em sementes (Ayet *et al.*, 1997). A síntese de AF se dá por um processo de fosforilação da molécula de Ins(3)P pela síntese *de novo*, outras formas de obtenção de AF são através da reciclagem de uma forma armazenada ou translocação via xilema. No entanto, a síntese *de novo* é reconhecida como a principal fonte de *mio*-inositol em sementes, o qual envolve a conversão de glicose-6P em *mio*-inositol-1P pela ação da enzima sintase da *mio*-inositol fosfato (MIPS1) (Loewus e Murthy, 2000).

Mutantes nulos da *MIPS1* são letais; dessa forma as vias biossintéticas influenciadas pelo Ins(3)P necessitam de outras abordagens de estudo. O silenciamento de RNA, mediado via RNAi possibilita a investigação de alterações na biossíntese e metabolismo de *mio*-inositol (Nunes *et al.*, 2006).

O silenciamento de RNA regula a expressão gênica de forma pós-transcricional por meio da degradação da sequência-específica de mRNAs alvo, diminuindo ou bloqueando a sua tradução. Esse mecanismo é sistêmico, como resultado, embora o gene endógeno expresse o mRNA este é degradado e ocorre redução na tradução de proteína (Zerbini *et al.*, 2005).

A enzima MIPS de soja apresenta 510 aminoácidos com peso molecular predito em 56,7 kDa. Wongkaew *et al.* (2010) analisaram a homologia da *MIPS1* em espécies vegetais de diferentes gêneros, as sequências variaram de 87 a 96% de similaridade. Em tomateiro a expressão de *MIPS1* até o momento não foi descrita ou caracterizada.

Nunes *et al.* (2006) produziram linhagens transgênicas de soja com inserção de uma construção para expressar um dsRNA e silenciar o gene *MIPS1*. A análise na progênie transformada indicou aumento do conteúdo de fósforo livre, redução de AF em sementes e aborto em algumas sementes. Todas as sementes abortadas estavam silenciadas quando verificado por RT-PCR. Esses autores sugeriram estudos adicionais na busca de elucidar relação entre padrões de expressão de *MIPS* e o desenvolvimento de sementes e viabilidade do embrião.

Com isso, o presente trabalho teve por objetivos verificar a eficiência do transgene contruído em *intron-hairpin-RNA* com fragmento da *MIPS* de soja *GmMIPS1* na indução do silenciamento em tomateiro e avaliar as alterações no desenvolvimento

de frutos e sementes, conteúdo de AF e açúcares em sementes e conteúdo de açúcares em folhas.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Curva de letalidade de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de tomateiro *Solanum lycopersicum* ao antibiótico higromicina.

Explantes de hipocótilos e cotilédones, de tomateiro, germinados *in vitro*, foram cultivados em meio de regeneração (MR) contendo os sais MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas de Nitsch (Nitsch e Nitsch, 1969), 2,0 mg L⁻¹ de zeatina, 0,01 mg L⁻¹ de ácido indolil-3-acético (AIA), 20 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de *mio*-inositol e 6,5 g L⁻¹ de ágar (Merck®). O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1, previamente à adição de ágar. Foram adicionados 300 mg L⁻¹ Timentin (GlaxoSmithKline®, EUA) e higromicina (Sigma Chemical Company, EUA) nas dosagens de 0,0; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5 mg L⁻¹.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com 37 µmol m⁻² s⁻¹ de irradiância, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 26 ± 2 °C. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições com 10 explantes cada, durante 80 dias, e recultivo a cada 20 dias. As variáveis analisadas foram: porcentagem de explantes com calejamento, unidades de ramos, massa fresca e teor de pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a* e *b* e carotenoides).

1.2.2 Transformação genética de tomateiro mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Sementes de tomate, desinfetadas com imersão em etanol 70% por 1 minuto, seguido por 20 minutos em solução de NaClO a 1,25% de cloro e enxágue em água deionizada estéril por três vezes, foram germinadas *in vitro*. O meio de germinação consistiu de sais MS meia-força, vitaminas de Nitsch, 0,1 g L⁻¹ de *mio*-inositol, 20 g L⁻¹ de sacarose, 6,5 g L⁻¹ de ágar (Merck®, Germany) e pH ajustado para 5,8 ± 0,1. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com 37 µmol m⁻² s⁻¹ de irradiância, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 26 ± 2 °C. Hipocótilos e cotilédones com 15 dias foram seccionados em fragmentos de aproximadamente 1 cm e pré-cultivados em meio MR, com a face adaxial voltada ao meio de cultivo, no escuro, durante 24 horas.

A bactéria *A. tumefaciens* GV 3101 contendo plasmídeo pC1300MIPS foi utilizada para a transformação genética. Para a construção do vetor pC1300MIPS, o

cassete de interferência $\Delta GmMIPS$ foi removido com XbaI e SacI do vetor pMIPSGM (Nunes et al. 2006) e transferido para o vetor pCambia1300.

Essa bactéria contendo vetor pC1300MIPS foi inoculada nos explantes cotiledonares e hipocotiledonares por imersão em suspensão de agrobactéria ($OD_{600} = 0,4$) durante 5 minutos. Logo após, os explantes foram dispostos sobre papel filtro estéril e transferidos para meio de regeneração (MR) coberto com papel filtro durante dois dias de cocultivo, sob irradiância de $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. A obtenção de regenerantes potencialmente transformados ocorreu mediante a transferência dos explantes com a face abaxial voltada para o meio MR seletivo contendo $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ de higromicina e 300 mg L^{-1} de Timentim.

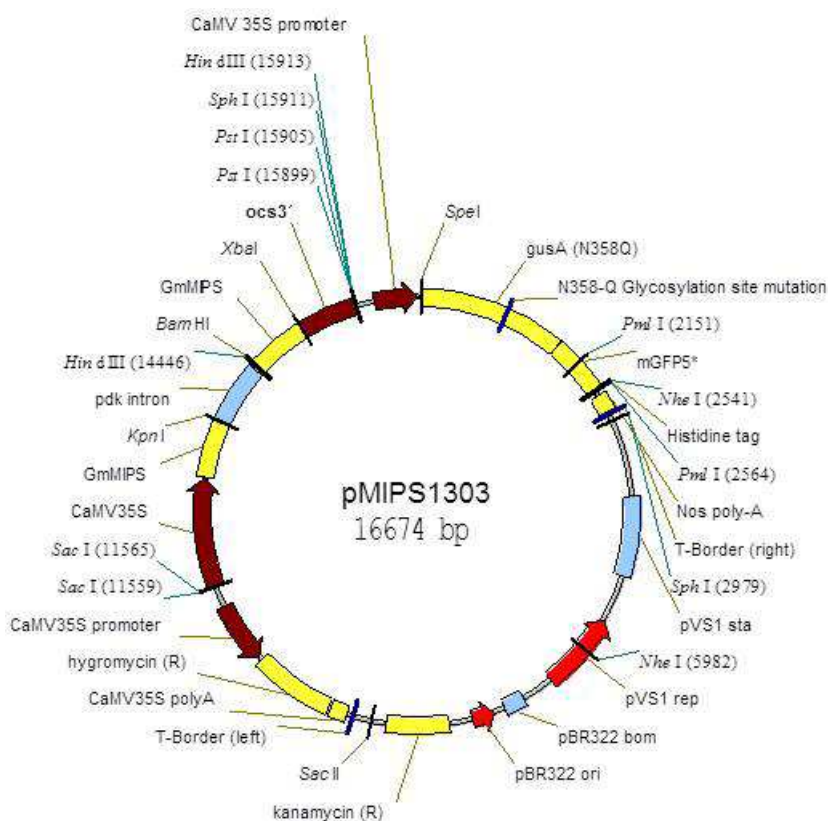


Figura 1. Vetor de transformação inserido na *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101

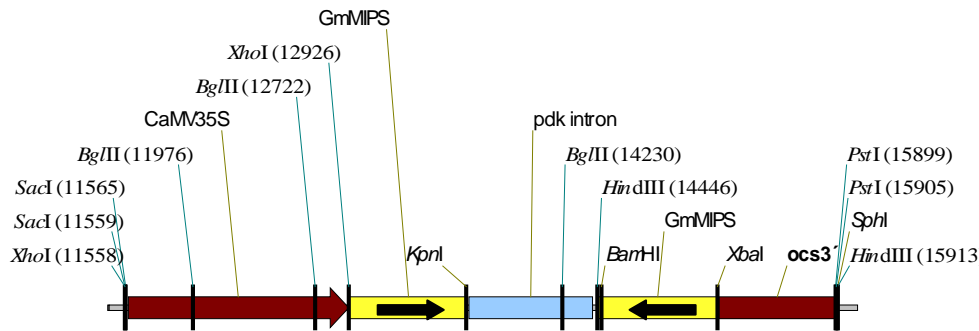


Figura 2. Detalhe do vetor de transformação: Sequência indutora de *intron-hairpin-RNA* constituída de promotor *CaMV 35S*, seguido por fragmento de *GmMIPS* no sentido senso, *pdk* intron, repetição antissenso do fragmento de *GmMIPS* e *ocs* terminator.

Brotos adventícios (de 1,5 cm) foram alongados em meio de cultivo contendo sais MS, 0,1 g L⁻¹ de *mio*-inositol, vitaminas de Nitsch, 20 g L⁻¹ de sacarose, 6,5 g L⁻¹ de ágar Merck®, 1,0 mg L⁻¹ de zeatina, 0,01 mg L⁻¹ de ácido indol-3-acético (AIA), 7,5 mg L⁻¹ de higromicina e 300 mg L⁻¹ de Timentin, com pH ajustado para 5,8 ± 0,1. Os ramos foram enraizados em meio de cultivo contendo sais MS, 0,1 g L⁻¹ de *mio*-inositol, vitaminas de Nitsch, 20 g L⁻¹ de sacarose, 6,5 g L⁻¹ de ágar Merck®, 0,2 mg L⁻¹ de AIA, 2 mg L⁻¹ de glicina, 300 mg L⁻¹ de Timentin e pH ajustado para 5,8 ± 0,1, na ausência do antibiótico seletivo.

As plântulas foram aclimatizadas em copos plásticos contendo substrato comercial Plantmax® (DDL Agro Indústria Ltda, Brasil) e cobertas por embalagens plásticas, proporcionando umidade relativa elevada na parte aérea. A diminuição da umidade para condições ambientais foi realizada gradativamente, através de orifícios nas embalagens durante uma semana; após isso, as embalagens foram retiradas e as plantas foram transferidas para vasos plásticos de 15 litros contendo substrato Plantmax® em casa de vegetação.

1.2.3 Análise histoquímica de Gus, PCR e quantificação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo

A confirmação da transgenia foi realizada pelo teste histoquímico de GUS em folhas e ovários (Jefferson *et al.*, 1987).

A análise da reação de polimerase em cadeia (PCR) foi feita com DNA isolado de discos foliares de acordo com Edwards *et al.* (1991). A reação de PCR foi realizada em termociclador (PTC-100, MJ Researcher, USA) com 25µL de solução contendo 40 ng de DNA, 60 mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 250 nM de cada dNTP; 200 nM de cada iniciador e 5 U de Taq polimerase (Invitrogen). A reação

foi tratada a 95 °C (5 min), seguido de 35 ciclos de amplificação (95 °C por 1 min, 50 °C por 1 min e 72 °C por 1 min) com um ciclo de alongamento final a 72 °C, durante 5 min.

Os iniciadores específicos para o inserto de transformação MIPS_{Kpn} (5´ - CGGTACCAAATCTCAGCCTCATTTTC-3´) e MIPS_{Eco} (5´ - GGAATTCACCACCGAACT TGTTCAC-3´), incluindo os setores para *Kpn*I e *Eco*RI, respectivamente, foram usados para amplificar um fragmento de 706 pb da sequência $\Delta GmMIPS1$.

A análise do conteúdo de DNA foi realizada através da citometria de fluxo. Para tal; o conteúdo de DNA (pg) foi quantificado de núcleos isolados de acordo com Doležel e Bartos (2005). Foram utilizados como controle de referência interna *Glycine max* Mill. (valor 2C = 2,5 pg de DNA) e analisadas plantas-controle germinadas *in vitro* na ausência de reguladores de crescimento e as linhagens transgênicas de tomateiro. Para cada amostra, no mínimo 10.000 núcleos foram analisados usando um visor de escala logarítmica. As análises foram realizadas com utilização de um citômetro Becton Dickinson® (FacsCalibur, EUA). Cada histograma citométrico foi salvo usando o software Cell Quest e analisado com o software WinMDI 2.8. O conteúdo de DNA nuclear (pg) das amostras foi estimado seguindo a equação: Amostra (2C DNA) = (Canal do pico G1 da amostra / Canal do pico G1 do padrão) × conteúdo de DNA do padrão.

1.2.5 Quantificação de pigmentos fotossintéticos de plantas transgênicas de tomateiro

Os pigmentos fotossintéticos foram extraídos de três discos foliares de 0,8 cm cada, de folhas do 3º entrenó em cinco repetições por tratamento, contendo uma extração de cada planta, utilizando DMSO saturado com carbonato de cálcio durante 48 horas em temperatura ambiente e protegido de luminosidade (Hiscox e Israeltam, 1979). O extrato foi mensurado em espectrofotômetro (modelo Genesys 10UV, Thermo Scientific, USA) em comprimentos de onda de 480, 649 e 665 nm. Os teores de clorofilas *a* e *b* e carotenoides foram determinados seguindo as equações propostas por Wellburn (1994) e expressos por $\mu\text{g cm}^{-2}$.

1.2.6 Análises físicas em frutos e quantificação de ácido fítico em sementes de plantas transgênicas e plantas-controle de tomateiro.

Frutos de 60 dias após a antese foram avaliados quanto à massa em gramas do fruto inteiro, polpa, mucilagem com sementes e número de sementes normais. Essas variáveis foram avaliadas isoladamente e utilizadas na determinação das razões: número de sementes normais/massa do fruto inteiro, massa da polpa/peso do fruto inteiro, massa da polpa/número de sementes normais, massa da polpa/sementes frescas com mucilagem. Foram analisadas cinco repetições por tratamento contendo três frutos cada repetição.

O ácido fítico de sementes de frutos de 60 dias após a antese foi quantificado conforme metodologia proposta por Haug e Lantzsc (1983). Para tanto, 0,015g de sementes normais, secas e pulverizadas de plantas-controle e plantas transformadas foram tratadas com 1,5 mL de HCl 0,2 M, agitadas durante 30 min a 25 °C; centrifugadas a 14.000 rpm por 15 min. Ao sobrenadante (0,5 mL) foi adicionado 1 mL de solução 0,11g L⁻¹ FeCl₃ em HCl 0,2 M, aquecido por 30 min a 100 °C, resfriado à temperatura ambiente e centrifugado a 4.000 rpm durante 15 min a 25 °C. Ao sobrenadante (0,5 mL) foram acrescentados 0,75 mL de solução de bipyridina (10 g de bipyridina, 10 mL de ácido tioglicólico em 1000 mL de água destilada). O produto foi quantificado em 519 nm e os valores obtidos foram transformados em concentração de AF pelo uso de uma curva padrão de fitato de sódio. A concentração de AF foi expressa em mg g⁻¹ em massa seca de sementes normais. Foram analisadas cinco repetições por tratamento contendo três análises bioquímicas por repetição, as análises bioquímicas foram extraídas de um homogeneizado de sementes secas e pulverizadas de vários frutos da mesma planta.

1.2.7 Análise da expressão gênica por reação de polimerase em cadeia em transcrição reversa (RT-PCR)

A reação de polimerase em cadeia em transcrição reversa (RT-PCR) do gene *MIPSI* foi realizada com o RNA extraído de sementes abortadas e normais com kit Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e tratadas com DNase. O cDNA foi sintetizado com transcriptase reversa SuperScript[®] III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O volume de cDNA na reação foi padronizado com o controle interno o gene *EF1-α* GenBank acesso n° X56856; iniciadores EF1F (5'-TGTTGCTGTTAAGGATTTGAAGCG-3') e EF1R (5'-

AACAGTTTGACGCATGTCCCTAAC-3'). O gene *LeMIPS* de *Lycopersicum esculentum* (agora *Solanum lycopersicum*) GenBank n° AI491091 foi amplificado pela sequência LEMIPSF (5'-CCAAGATGAAGTCAGTGCTGGT-3') LEMIPSR (5'-ATGTTGTTCTCTGGTGCCAGTC-3') fragmento de 580 pb. A PCR foi feita a 95 °C (5 min) submetida a 20 ciclos de amplificação (95 °C por 1 min, 50 °C por 1 min e 72 °C por 1 min), com um ciclo de alongamento final de 5 min a 72 °C.

1.2.9 Quantificação de açúcares em sementes por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC).

Os açúcares sacarose, estaquiose, rafinose, xilose, glicose, inositol e frutose foram quantificados em sementes de plantas-controle e plantas transformadas. A extração dos açúcares seguiu o protocolo estabelecido por Guimarães *et al.* (2001). Inicialmente, a extração da fração oleosa de 0,03 g de sementes secas e pulverizadas foi realizada por 3 extrações sucessivas com 1,0 mL de éter de petróleo a 42 °C durante 5 min. Em seguida, os oligossacarídeos foram extraídos por três etapas sucessivas com etanol 80% a 100 °C por 5 min. O extrato alcoólico total foi evaporado a 50 °C, e os oligossacarídeos ressuspensos em 1,0 mL de etanol 80% e armazenados a -20 °C. Essa solução foi submetida à centrifugação 14.000 rpm por 10 min e filtrada em filtro 0,45 µm Merck® (Millipore, Alemanha).

O extrato filtrado foi analisado em Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC) (SHIMADZU, modelo SPD-10A VP, Japão) equipado com detector de índice de refração RID 6 A, coluna de fase estacionária aminopropil (-NH₂) (30 cm x 4,5 mm), fluxo 1,0 mL min⁻¹ sobre pressão 42 Kgf, fase móvel de acetonitrila: água (80:20) a 35 °C. Os oligossacarídeos foram identificados em comparação com os tempos de retenção e quantificados por curva de concentração padronizada. Foram analisadas cinco repetições por tratamento contendo três análises bioquímicas por repetição, as análises bioquímicas foram extraídas de um homogeneizado de sementes secas e pulverizadas de vários frutos da mesma planta.

1.2.10 Teste de germinação, vigor germinativo e desenvolvimento de plântulas.

Para o teste de germinação e vigor germinativo através da análise de primeira contagem de germinação, foram utilizadas três repetições com 10 sementes cada. As sementes normais de plantas transgênicas e plantas-controle foram semeadas em caixas tipo gerbox contendo papel filtro Germitest (J. Prolab®, Curitiba, Brasil) umedecido

com água na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. As sementes foram incubadas em germinadores da marca Tecnal (TE-403, Brasil) a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas.

O resultado consistiu na percentagem de plântulas normais obtidas no quinto dia após a semeadura para o vigor germinativo e no décimo quarto dia após a semeadura para a germinação total, como descrito nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

Para o teste de desenvolvimento de plântulas, cada tratamentos constituiu três repetições de 10 sementes, semeadas sobre uma linha de referência, de forma linear e equidistante em caixas tipo gerbox entre papel filtro, tipo Germitest, umedecido com água na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. As caixas foram colocadas em germinador a 25°C com fotoperíodo de 12 horas na posição vertical. No décimo quarto dia após a semeadura foram efetuadas as medições do comprimento de hipocótilo e radícula das plântulas normais com o auxílio de régua graduada. Os resultados foram expressos em centímetros por plântulas normais (Nakagawa, 1999).

1.2.11 Análise dos dados

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Plantas-controle e as três linhagens selecionadas de plantas transgênicas foram multiplicadas por estaquia em 5 repetições mediante o enraizamento adventício de ramos basais, cultivadas até a frutificação sob condições de casa de vegetação em sistema hidropônico individual de 5 L, contendo solução meia-força de Hoagland e Harnon (1950) renovada semanalmente. Os dados foram submetidos ao Teste-*t* Student ($p < 0.05$).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Dosagem de seleção ao antibiótico higromicina em explantes de tomateiro *Solanum lycopersicum*

Em meio de regeneração, na ausência do agente seletivo higromicina, nos 40 explantes cultivados de cada tipo de explante, houve 100% de calejamento, 13 brotações em segmentos cotiledonares (32,5%) e 24 brotações em segmentos hipocotiledonares (60%). Na presença do agente seletivo os explantes apresentaram decréscimo nas respostas morfogênicas. A concentração de 5 mg L⁻¹ de higromicina apresentou 25% de calejamento, 3 brotações em explantes cotiledonares (7,5 %) e 5 brotações em explantes hipocotiledonares (12,5%). Na concentração de 7,5 mg L⁻¹ não houve regenerações e áreas necróticas, enquanto nas dosagens de 10 e 12,5 mg L⁻¹ de higromicina, observou-se ausência de respostas morfogênicas, senescência, necrose e morte dos explantes.

Houve decréscimo no conteúdo de clorofilas *a* e *b* em segmentos de cotilédones e hipocótilos (Figura 2 A - B), diminuição das massas frescas e número de calos e ramos em resposta às dosagens do agente seletivo (Figura 2 C - D).

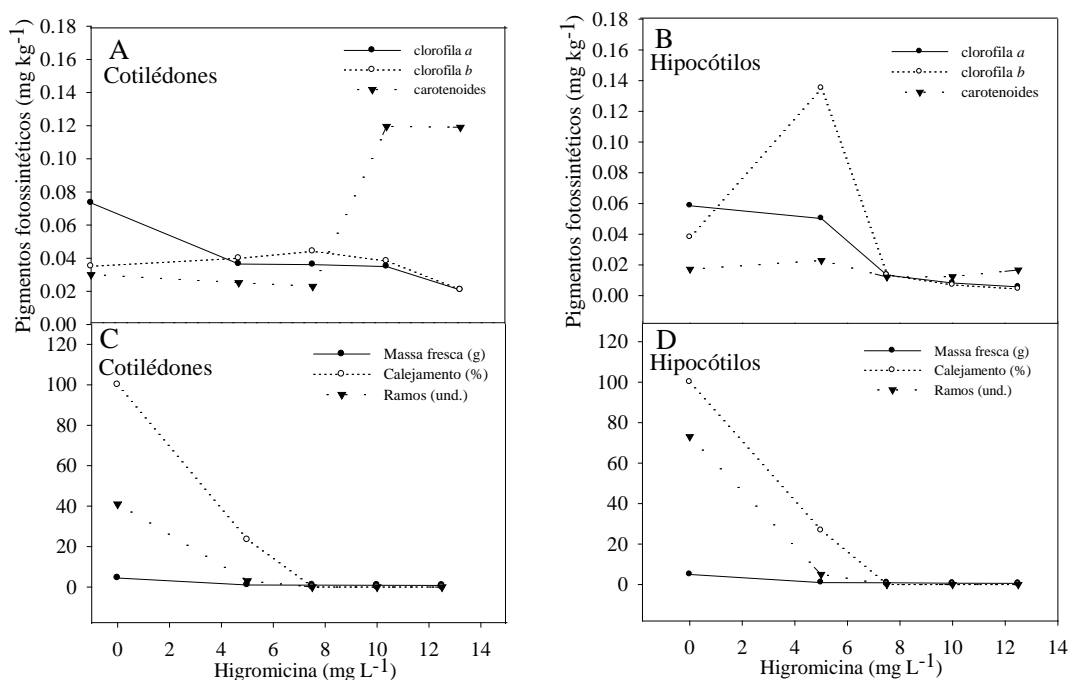


Figura 2. Pigmentos fotossintéticos e respostas morfogênicas de explantes de cotilédones e hipocótilos de tomateiro 'Moneymaker' sob dosagens de higromicina (0,0; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5 mg L⁻¹) cultivados durante 80 dias. **A e B** - Pigmentos fotossintéticos de cotilédones e hipocótilos respectivamente. **C e D** - Massa fresca (g), Calejamento (%) e Ramos (unidades) de cotilédones e hipocótilos, respectivamente.

Nas condições experimentais, a dosagem de 7,5 mg L⁻¹ de higromicina se mostrou ideal para a seleção no processo de regeneração em segmentos de cotilédones e

hipocótilos de tomateiro submetidos à transformação genética por *A. tumefaciens*. Nessa dosagem foi visualizada a manutenção da viabilidade do explante, porém, sem apresentar regeneração adventícia de brotos. Na dosagem de 5,0 mg L⁻¹ de higromicina houve diferenciação de brotos tanto nos explantes de hipocótilos quanto nos cotilédones resultando, portanto, em dosagem ineficiente para ser utilizada em processos de transformação, uma vez que permitiria a obtenção de escapes. Dosagens acima de 7,5 mg L⁻¹ de higromicina mostraram-se muito tóxicas, levando os explantes a apresentarem áreas necróticas, em especial na superfície do explante em contato com o meio contendo o agente seletivo.

A higromicina B é um antibiótico aminoglicosídico que inibe a síntese de proteínas por perturbar a translocação e promover erro de tradução no ribossomo 80S (Invitrogen Life TechnologiesTM, 2013). A resistência à higromicina é conferida pelo gene de resistência à higromicina de *E. coli* hygromycin phosphotransferase (*hpt*) presente em plasmídeos de transformação para a tolerância ao antibiótico higromicina, possibilitando o crescimento e desenvolvimento em detrimento das demais células com a ausência desse gene.

O sucesso dos protocolos de regeneração e transformação está relacionado ao potencial regenerativo do tecido e é dependente de uma série de fatores como genótipo, idade da planta matriz, qualidade fisiológica da planta matriz, tamanho e posição dos explantes no meio de cultivo, composição do meio de cultivo, reguladores de crescimento e agentes seletivos (Otoni *et al.*, 2003; Collonier *et al.*, 2001.; Picoli *et al.*, 2007; Costa *et al.*; 2007). Todas essas variáveis estão presentes no processo de transformação e uma avaliação prévia dos principais fatores (explantes, meio de cultivo e dosagem de seleção) no ambiente laboratorial (luminosidade, umidade e temperatura) e reagentes a serem aplicados na pesquisa, podem elucidar o comportamento dos explantes naquelas situações e garantir o sucesso na obtenção de regenerantes transformados.

Exemplificando, nossos tratamentos obtiveram transformantes em seleção em 7,5 mg L⁻¹ de higromicina em explantes de cotilédones e hipocótilos de tomateiro de até 15 dias de cultivo para germinação, anterior a emissão de folhas verdadeiras; enquanto, encontramos na literatura protocolos utilizando outros métodos de cultivo e explantes com idades diferentes de tomateiro, com dosagem de seleção superior. Nesses trabalhos os autores relatam a obtenção de transformantes utilizando 20, 25 e 40 mg L⁻¹ de

higromicina como agente seletivo (Ma *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 2006, Chaudhry e Rashid, 2010).

Ma *et al.* (2003) utilizou 20 mg L⁻¹ de higromicina na transformação de tomateiros ‘XiuNu’ em discos foliares, obtendo ramos de calos transformados após 4 semanas de cultivo. Chaudhry e Rashid (2010) testaram as dosagem de 10, 25 e 50 mg L⁻¹ de higromicina em explantes de discos foliares e hipocótilos de plantas com 21 dias de idade nas cultivares Riogrande e Roma de tomateiro. Nesse experimento a dosagem de 50 mg L⁻¹ não apresentou regenerantes e plantas transgênicas, enquanto a dosagem de 10 mg L⁻¹ resultou na formação de escapes acima de 50% entre as plantas regeneradas. Dentre as doses avaliadas, 25 mg L⁻¹ de higromicina resultou em dose satisfatória. Roy *et al.*, 2006 utilizou a dosagem de 40 mg L⁻¹ de higromicina na seleção de transgênicos transientes em tomateiros ‘Pusa Ruby’ que foi posteriormente confirmado a integração estável no genoma nuclear.

Como exemplificado, a idade, tipo de explantes e meio de cultivo são determinantes para a obtenção de regenerantes. Essas respostas de organogênese devem ser suprimidas de maneira não letal com os agentes seletivos, e essa dosagem deve ser rigorosamente e cuidadosamente estabelecida. O estabelecimento do protocolo com as condições, material vegetal, equipamentos e reagentes do laboratório nesse teste de regeneração em dosagem seletiva, resulta em importantes economias, seja ela de tempo experimental ou de custos em reagentes, uma vez que os agentes seletivos são em geral de alto custo comercial.

1.3.2 Teste histoquímico de GUS

Folhas de plantas regeneradas do processo de transformação e seleção foram positivas para expressão do gene *Gus* em comparação as plantas-controle. Da mesma forma, frutos imaturos dessas plantas apresentaram coloração positiva em ensaio histoquímico (Figura 3).

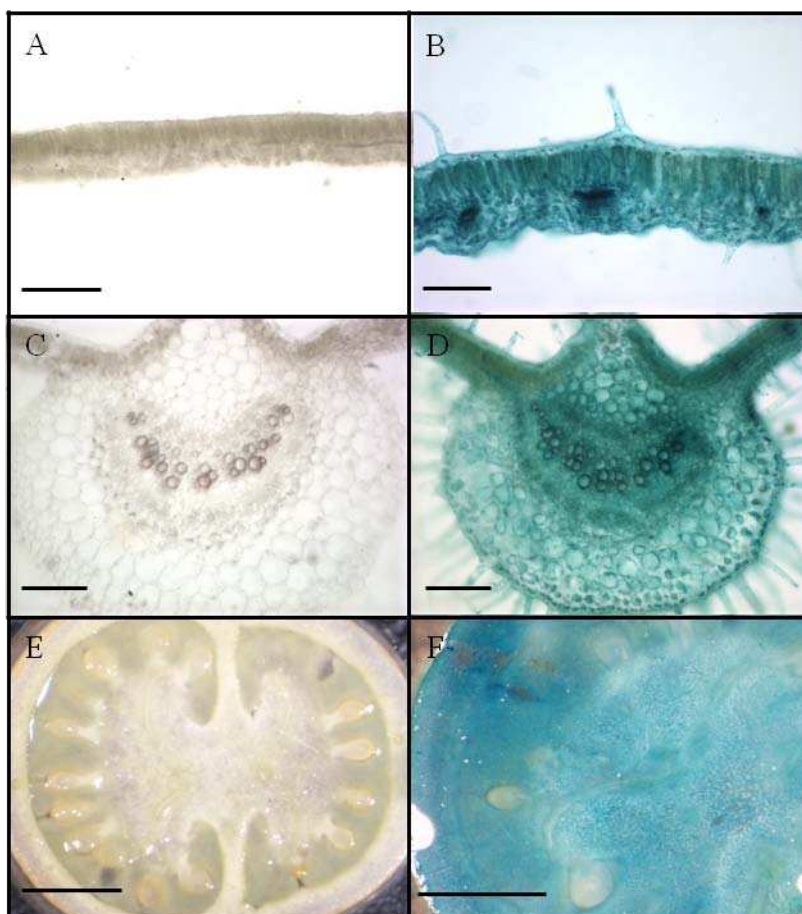


Figura 3. Teste histoquímico GUS em folhas e frutos de plantas-controle e plantas potencialmente transformadas com pMIPS1303 em tomateiro ‘Moneymaker’. **A, C e E** - cortes transversais da lâmina foliar, nervura central e fruto imaturo em plantas-controle respectivamente; **B, D e F** - cortes transversais de lâmina foliar, nervura central e fruto imaturo em plantas putativamente transformadas respectivamente, apresentando a expressão típica do gene *GUS*. Barra de A-D: 200 μ m. Barra E e F: 0,2 cm.

A expressão do gene repórter *Gus* produz a enzima beta glucoronidase que catalisa a hidrólise dos β -D-glucoronídeos. A adição do substrato artificial p-nitrofenil- β -glucoronídeo é hidrolisado pela enzima produzindo a coloração azulada que caracteriza o tecido transformado. Dessa forma, transformações contendo o gene repórter *Gus* podem ser pré-selecionadas com a análise histoquímica como um marcador visual da transformação. Essa análise de confirmação da transformação genética tem sido realizada por vários autores, como Jefferson (1987), Jefferson *et al.* (1987), Otoni *et al.* (2003) e Oliveira *et al.* (2009). Especificamente em tomateiro, esse teste histoquímico foi utilizado em folhas (Chaudhry e Rashid, 2010), folhas e calos (Ma *et al.*, 2003) e folhas, raízes, flores e frutos (Hiwasa *et al.*, 2012) na confirmação da transformação genética via *A. tumefaciens*.

1.3.3 Análise de PCR e citometria de fluxo

A PCR confirmou a inserção do transgene $\Delta GmMIPS$ de 706 pb no DNA extraído de folhas de plantas regeneradas no processo de transformação e GUS positivas. A separação de eletroforese comparou as ampliações com marcador molecular 1 Kb, amplificação do plasmídeo de transformação como controle positivo e plantas-controle como controle negativo em gel de agarose a 0.8% (Figura 4 A).

Quanto a citometria de fluxo, verificamos que a via morfogênica por organogênese indireta, via calos, pode ter contribuído para a menor estabilidade genética na ploidia dos regenerantes, ocasionando alterações na ploidia das plantas transgênicas. As três plantas-controle apresentaram 2.1, 2.11 e 2.1 pg de DNA. Foram obtidas três plantas de tomateiro transgênicas. A planta de tomateiro que apresentou quantidade de DNA (2.1 pg), compatível às plantas-controle, recebeu a denominação MT 2 (Figura 4 C). A planta de tomateiro transgênico MT 1 apresentou células com variação de ploidia, com conteúdo de DNA em núcleos isolados respectivos aos valores 2C, 4C e 8C, caracterizando-se como um mixoplóide (Figura 4 D) a planta de tomate transgênica MT 3 apresentou tetraploidia, verificada através da quantidade de DNA duplicado nos núcleos isolados (Figura 5 E). As análises de citometria de fluxo apresentaram CV inferiores a 3%.

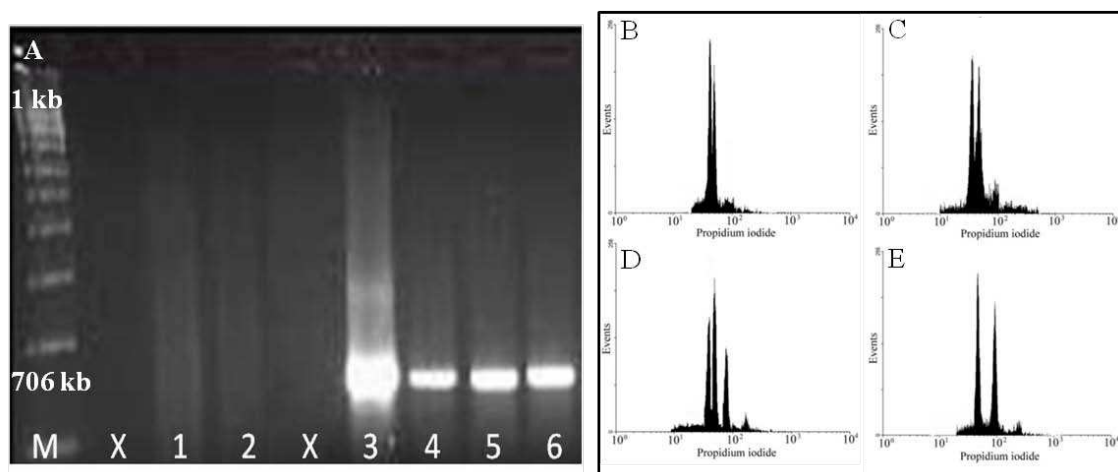


Figura 4. Separação eletroforética dos produtos da análise de PCR com iniciadores para o gene $\Delta GmMIPS1$ e histogramas de citometria de fluxo de tomateiro ‘Moneymaker’ de plantas-controle e plantas transgênicas **A:** M - marcador molecular 1 Kb, x - ausência de amostras, **1 e 2** - Plantas-controle de tomateiro ‘Money-maker’ **3** - Controle positivo (vetor de transformação); **4 a 6** - Plantas de tomateiro transgênicas MT 1, MT 2 e MT 3 respectivamente. **B-** Citograma de plantas-controle ‘Moneymaker’ germinadas *in vitro*; **C-** Linhagem transgênica (MT 2) com conteúdo de DNA compatível com a planta controle; **D-** Linhagem transgênica (MT 1) evidenciando picos com valores 2C, 4C e 8C, caracterizando a ocorrência de mixoploidia; **E-** Linhagem transgênica (MT 3) com valor duplicado de DNA. O primeiro pico nos citogramas A-D corresponde ao padrão interno *Glycine max* (2,5 pg).

A instabilidade genética comumente observada em plantas cultivadas e mantidas *in vitro* durante períodos prolongados pode representar limitação do emprego das técnicas de cultivo *in vitro*, sobretudo na propagação massal de plantas e na transformação genética (Evans *et al.*, 1984; Larkin e Scowcroft, 1981; Karp, 1991).

Os resultados obtidos nesse trabalho concordam com o descrito por Ellul *et al.* (2003), em que os autores relatam o nível de ploidia alterado de plantas transgênicas de 5 variedades de tomateiro, analisadas por citometria de fluxo em que a instabilidade genética se apresentou dependente do genótipo e do processo de cultivo *in vitro* para transformação genética.

Orbovié *et al.* (2008) ao analisar a variabilidade genética de cinco populações de limoeiro obtidos através de diferentes procedimentos de cultura *in vitro*, também identificaram plantas contendo células diploides e tetraploides. Nunes *et al.* (2006), trabalhando com silenciamento de *MIPS* em soja, não relataram diferenças morfológicas na parte aérea entre os eventos transformados e os controles, porém sugeriram a avaliação destas características em estudos complementares.

Ressalta-se assim a importância e a necessidade da avaliação do nível de ploidia dos transformantes primários, oriundos de processos de organogênese direta ou indireta previamente a qualquer avaliação que sugira alterações ocasionadas pela inserção do transgene e, acima de tudo, na intenção de incorporá-los em programas de melhoramento.

1.3.5 Quantificação de pigmentos fotossintéticos.

Os conteúdos de clorofilas *a* e *b* e carotenoides entre as plantas-controle e as linhagens transgênicas não apresentaram diferença significativa (Figura 5).

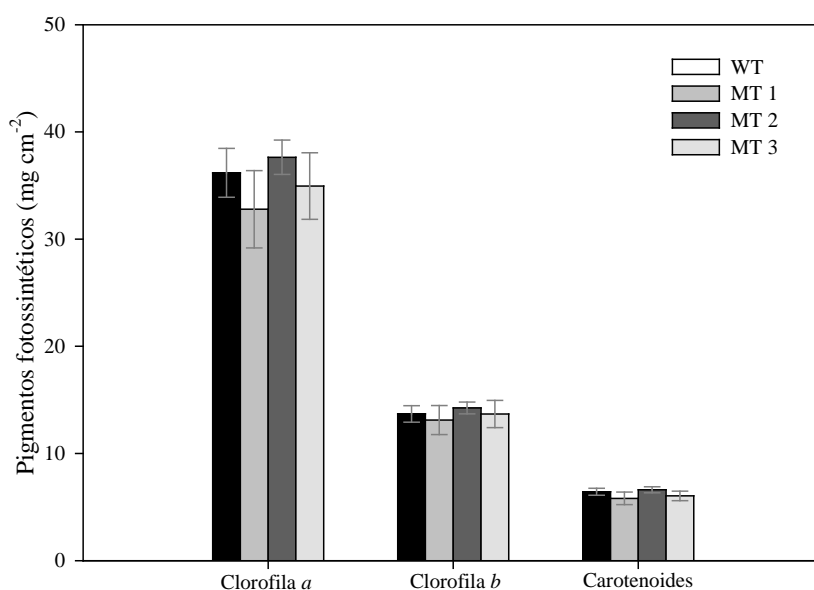


Figura 5. Pigmentos fotossintéticos em folhas de tomateiro ‘Moneymaker’ de plantas-controle (WT) e transgênicas (MT1, MT2 e MT3) coletado às 12:00 horas de folhas do terceiro entrenó. Pigmentos calculados em relação à área foliar. Barras indicam erro padrão (n = 5)

Em célula vegetal os fosfatidil-inositídeos estão envolvidas nas respostas celulares a estímulos ambientais por participarem do ancoramento da nitrato redutase. Uma glicosil-fosfatidilinositol (GPI) é responsável pelo ancoramento da nitrato redutase nas membranas celulares; essa enzima é relacionada à resposta ao estímulo de luz azul na absorção de nitrato. (Kunze *et al.*, 1997; Stohr *et al.*, 1995), o que acreditávamos que poderia influenciar nas respostas luminosas e assim no conteúdo de pigmentos fotossintéticos; o que não foi encontrado na quantificação dos pigmentos.

1.3.6 Análises físicas em frutos e quantificação de ácido fítico

As variáveis analisadas na planta-controle foram superiores às encontradas em plantas transgênicas nas características massa do fruto, massa da polpa e massa de sementes frescas (sementes e mucilagem), indicando frutos maiores e mais desenvolvidos em plantas-controle. Porém razões realizadas com as características individuais, principalmente em relação à quantidade de sementes normais, indicam modificação no padrão de desenvolvimento de partes do fruto em plantas transgênicas quando comparado com plantas-controle.

Os frutos das plantas transgênicas apresentam diferença significativa em algumas razões onde o fator número de sementes foi abordado. Assim, as razões entre a

massa da polpa e número de sementes normais foi superior em plantas transgênicas. Essa razão explica que em relação ao fruto inteiro, a porção de polpa produzida em frutos transgênicos é maior, devido o menor número de sementes. Da mesma forma, ao compararmos a razão entre o número de sementes e a massa do fruto inteiro, houve diferença, indicando que independente da massa do fruto, a porção sementes normais em unidades é reduzida em frutos de plantas transgênicas. Esses resultados sugerem que, indiferente ao tamanho e massa do fruto, há redução na quantidade e massa de sementes normais, quando comparado às plantas-controle (Figura 6 e 7).

Registre-se também que em plantas-controle, para cada grama de fruto produzido, em média, uma semente é formada (número de sementes/massa do fruto = 1,0410 sementes g^{-1}); já em plantas transgênicas, para cada grama de fruto aproximadamente 0,3 sementes são formadas, assim, o que corresponde a uma redução de 70% na quantidade de sementes normais, apresentada na linhagem MT 1.

As razões peso da polpa sobre massa da mucilagem e sementes (com endocarpo) e massa da polpa sobre a massa do fruto inteiro, não foram significativas quando comparado o evento transgênico diploide (MT 2) e o tetraplóide (MT 3) com a planta controle, confirmando que o padrão de desenvolvimento da polpa não é alterado em plantas transgenicas.

Os frutos da planta MT 1 foram diferentes e superiores nas relações entre peso de polpa e peso de sementes com mucilagem e peso de polpa sobre peso de fruto inteiro. Isto pode ser devido à mixoploidia apresentada, uma vez que essa planta apresentou frutos menores, porém com pericarpo bem desenvolvido e com a presença de poucas ou nenhuma sementes.

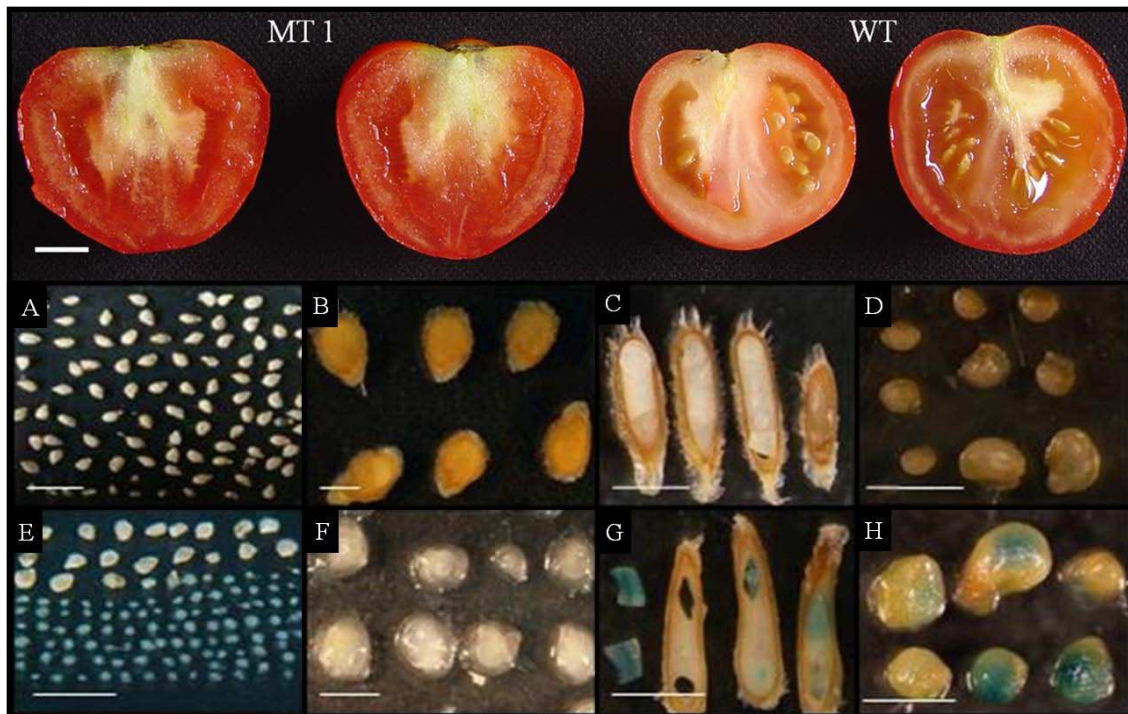


Figura 6. Comparação entre frutos e sementes da planta-controle (WT) e evento transformado MT 1 com 60 dias após a antese, selecionadas por tamanho similar. **MT 1**- evento transformado seccionado longitudinalmente, com ausência de sementes normais; **WT**- planta-controle seccionada longitudinalmente apresentando sementes normais e pericarpo menos desenvolvido. Barra = 1 cm. **A** - Sementes de plantas-controle; **B** - sementes predominantes em frutos de plantas-controle; **C** e **D** - Teste histoquímico de *GUS* em sementes normais seccionadas longitudinalmente e abortadas de plantas-controle, respectivamente; **E** - Sementes de fruto de planta transformada MT 1; **F** - sementes predominantes no fruto de plantas transformada; **G** e **H** - Teste histoquímico de *GUS* em sementes normais seccionadas longitudinalmente e abortadas de plantas transformadas. Barras = 0,2 cm.

As análises de razões (número de sementes normais/massa do fruto inteiro, massa da polpa/peso do fruto inteiro, massa da polpa/número de sementes normais, massa da polpa/sementes frescas com mucilagem) tiveram o propósito de verificar se as linhas transgênicas estão sendo beneficiadas ou prejudicadas quanto ao desenvolvimento de setores do fruto. Essa alteração resultou em proporções entre sementes frescas, número de sementes e massa da polpa, todos em relação ao fruto inteiro, diferentes das encontradas em frutos de plantas-controle.

As relações contendo a variável peso da polpa não apresentaram diferença significativa nas plantas diploides e tetraploides, de forma que o desenvolvimento de sementes é o único fator modificado em todas as linhagens transgênicas. Porém a planta mixoploide MT 1 apresentou incremento de polpa quando comparado com os demais frutos (Figura 7).

O silenciamento da *MIPS* promoveu a redução dos conteúdos de fitato em sementes com endosperma bem desenvolvido. As quantificações de ácido fítico (AF)

expressas em mg g^{-1} de massa seca de sementes normais revelaram diferença significativa entre plantas-controle e transgênicas (Figura 7 I).

Isso se torna interessante, pois os frutos apresentaram menor quantidade de sementes normais, e mesmo estas apresentaram redução significativa do conteúdo de ácido fítico. Logo, ao avaliar o fruto inteiro, a redução de fitatos ocorre de duas maneiras: primeiro, por produzir menor quantidade de sementes normais, órgão de estoque de ácido fítico, segundo por possuir conteúdo de ácido fítico reduzido nas sementes produzidas.

Os resultados obtidos sugerem que as plantas transgênicas de tomate que apresentaram o gene *MIPS* silenciado podem ter produzido menor concentração de *mio*-inositol fosfato, que é um precursor metabólico de AF. Assim, a menor concentração de AF nas sementes transgênicas.

O estudo de redução de fitato se concentra em grãos devido à produção animal, que utiliza destes grãos como base da alimentação animal para crescimento e engorda; assim, pesquisas e técnicas buscam a melhor conversão de alimento por peso de animal. Porém, esse estudo em alimentos de consumo humano tem ficado a desejar e as barreiras contra a produção e consumo humano de transgênicos desestimulam as pesquisas nessa área. Apesar disso, a produção de transgênicos que visam frutos com menores teores de fatores antinutricionais e sua aplicação em programas de melhoramento e para uso na alimentação humana e de animais tem visibilidade de pesquisadores.

Vale ressaltar que o fitato é um conteúdo indispensável na viabilidade de sementes e, em doses baixas na alimentação humana apresenta atividade anticancerígena (Vucenik e Shamsuddin, 2006; Singh e Agarwal, 2005) com propriedades benéficas à saúde, especialmente atividades antioxidantes e anti-calcificante (prevenção da formação de pedra nos rins) (Grases *et al.*, 2007) e atividade anti-neoplásica no intestino grosso (Harland e Morris, 1995).

Desta forma, os benefícios potenciais de AF também devem ser levados em consideração ao projetar os experimentos de melhoramento. Nesta busca, as ferramentas utilizadas e mais citadas na literatura são a transgenia com inserção ou superexpressão da enzima fitase [*L-mio*-inositol-(1,2,3,4,5,6)-hexaquisfosfato fosfohidrolase], alteração ou silenciamento de uma ou duas isoformas de *MIPS*, modificações com inibição das cinases de fosfato de inositol e o melhoramento clássico. Todas essas técnicas estão ainda sendo abordadas e até o momento não foi definida a melhor estratégia de

melhoramento vegetal para diminuição de AF, mas demonstramos aqui que o silenciamento de *MIPS* é uma técnica promissora.

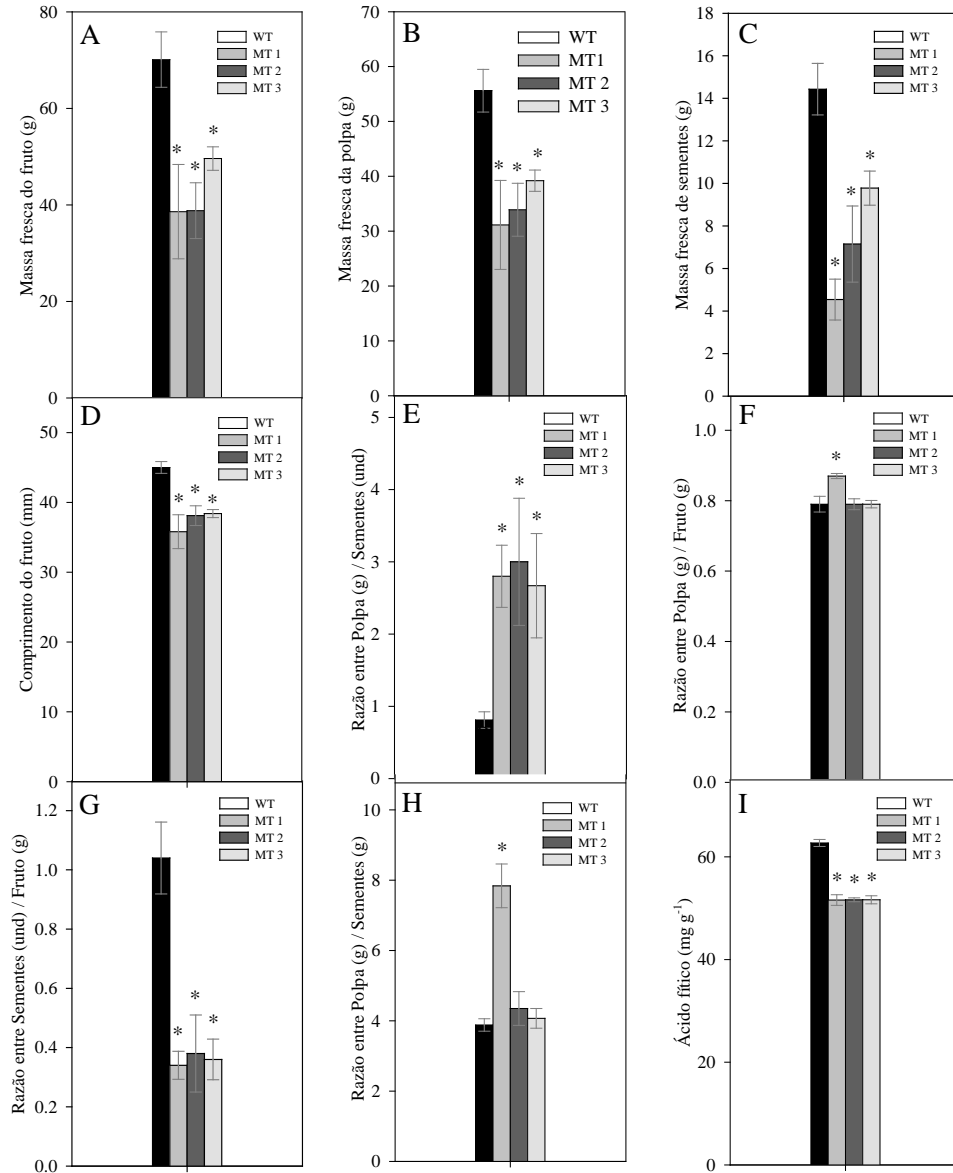


Figura 7. Características físicas de frutos e quantificação de ácido fólico em sementes de tomateiro ‘Moneymaker’. Médias e razões foram determinadas em frutos de plantas-controle e plantas transgênicas aos 60 dias após a antese. **A-** massa fresca do fruto (g), **B-** massa fresca da polpa (g), **C-** massa fresca das sementes; **D-** Comprimento vertical do fruto; **E-** razão entre massa da polpa/número de sementes; **F-** razão entre massa de polpa/massa do fruto; **G-** razão número de sementes/massa do fruto; **H-** razão entre massa da polpa/massa de sementes (g); **I-** Conteúdo de ácido fólico em sementes secas (mg g⁻¹). Asterisco indica diferença significativa pelo teste-*t* ($P > 0.05$) em comparação com a planta-controle. Valores representam as médias \pm erro padrão ($n = 5$).

1.3.7 Análise da expressão gênica em sementes.

Sementes abortadas de plantas transgênicas apresentaram silenciamento gênico. A expressão de MIPS ocorreu em sementes normais de plantas transgênicas e sementes normais e abortadas de plantas-controle. Assim, acredita-se que a ausência da expressão do gene *MIPS* esteja envolvida no aborto de embriões e desenvolvimento de sementes, porém, seu envolvimento não é determinante, uma vez que sementes de plantas-controle abortadas apresentam expressão desse gene (Figura 8).

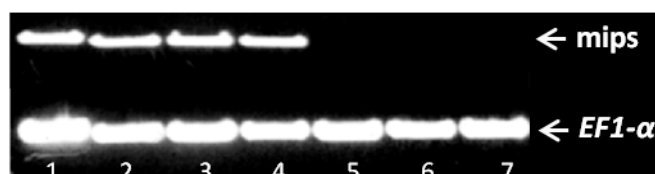


Figura 8. RT-PCR do gene *MIPS* em sementes de plantas transgênicas e plantas-controle de tomateiro 'Moneymaker'. **Linhas 1, 2 e 3** - sementes normais de plantas-controle, plantas transgênicas MT 1, MT 2 respectivamente. **Linhas 4, 5, 6 e 7** - sementes abortadas dos indivíduos plantas-controle e plantas transgênicas MT 1, MT 2 e MT 3 respectivamente.

A homologia das sequências de nucleotídeos da *MIPS* em diferentes espécies vegetais de diferentes gêneros varia de 87 a 96% com maior expressão em sementes, caules e raízes e em menores quantidades em folhas jovens em *Vigna radiata* (Wongkaew *et al.*, 2009). A estrutura genômica e organização da *MIPS* demonstrou regiões altamente conservadas em nível de nucleotídeos em diversos organismos, incluindo leveduras, *A. thaliana*, *C. paradisi*, *Nicotiana tabacum* e *Z. mays*. (Hegeman *et al.*, 2001). Estes dados nos permitem inferir que sequências de outras espécies podem ser utilizadas na promoção do silenciamento e que estes tecidos: Sementes, caules raízes e folhas podem ser analisados para verificar a eficiência do silenciamento.

Em tomate, através de análise *in silico* no banco de dados de tomate Sol Genomics Network, a análise de alinhamento de nucleotídeos em blastn no genoma de tomate, utilizando como referência a sequência de soja AF293970 (Hegeman *et al.*, 2001) encontrou cinco possíveis regiões codificadoras para a sintase da *mio*-inositol-3-fosfato, dentre essas, apenas duas apresentam tamanho semelhante as demais enzimas MIPS1 de outras espécies: Solyc05g051850.2.1 localizada no cromossomo 5 e Solyc04g054740.2.1 localizada no cromossomo 4. Por meio do programa Clustalw 2.1, o alinhamento das sequências de nucleotídeos de AF293970 com Solyc05g051850.2.1 e Solyc04g054740.2.1 apresentou 92% e 90% de identidade entre as sequências, respectivamente. A sequência de nucleotídeos inserida no plasmídeo de transformação

alinhas com o Solyc05g051850.2.1 e Solyc04g054740.2.1 apresentou percentual de identidade de 80,11 e 79,55% respectivamente (dados não apresentados).

A expressão do gene *MIPS* em sementes de *Passiflora edulis* foi relatada por Abreu *et al.* (2006) em todos os estádios de desenvolvimento analisados, e esses autores observaram nível máximo de expressão, com pico ao 9º dia após a polinização. Chun *et al.* (2003) detectaram transcritos em sementes de soja em diferentes estágios de desenvolvimento, enquanto Hegeman *et al.* (2001) afirmam que em sementes de soja a expressão do gene *MIPS* ocorre nos primeiros estágios de desenvolvimento, com sementes de até 10 mm de comprimento.

Resultado semelhante foi encontrado em sementes de soja por Nunes *et al.* (2006), ao inserir o mesmo cassete de silenciamento da sintase da *mio*-inositol fosfato desse estudo. Nesses transgênicos houve aborto de sementes em grande quantidade. Sementes normais e abortadas foram avaliadas quanto à presença do transgene e quanto à expressão de *MIPS*. Os autores concluíram que 98% das sementes abortadas possuíam o transgene de silenciamento e todas as sementes bem desenvolvidas não possuíam o transgene, sugerindo que a integração do transgene de silenciamento $\Delta GmMIPS$ foi responsável pelo aborto das sementes.

1.3.9 Identificação e quantificação de açúcares.

Em extrato foliar de plantas-controle e transgênicas a xilose não apresentou diferença significativa, enquanto sacarose, inositol e frutose foram significativamente reduzidos quando comparados com plantas-controle (Figura 9 A). Estaquiase, rafinose e glicose não foram detectadas em folhas.

Nos extratos de sementes normais os conteúdos de sacarose, glicose, rafinose e xilose apresentaram diferença significativa comparando as linhas transgênicas e plantas-controle. Os açúcares estaquiase, inositol e frutose não foram identificados em sementes (Figura 9 B).

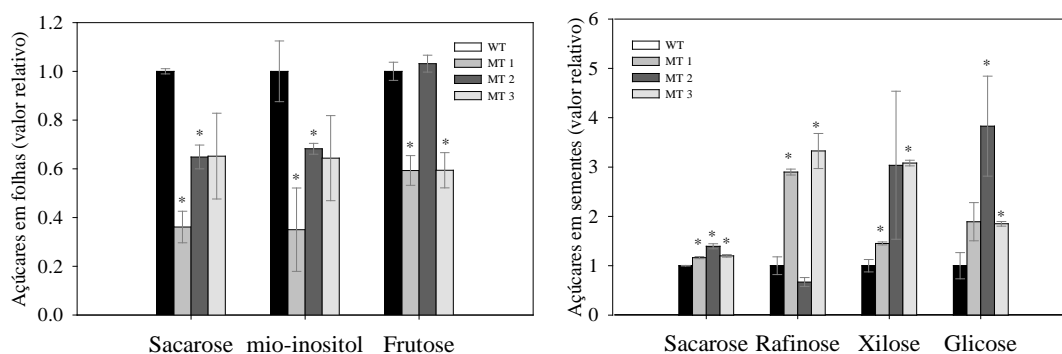


Figura 9. Valores relativos de açúcares em folhas e sementes normais de plantas-controle (WT) e transgênicas (MT 1, MT 2 e MT 3) de tomateiros ‘Moneymaker’. Asterisco indica diferença significativa pelo teste-*t* ($p > 0.05$) em comparação com as plantas-controle, barras indicam erro padrão ($n = 5$).

Em sementes normais de plantas transgênicas, independente de sua ploidia, o conteúdo de sacarose foi maior e diferente comparado as plantas-controle, em especial à planta diploide MT 2, que apresentou a mais alta concentração de sacarose. O mesmo padrão é encontrado na concentração de glicose com acúmulo em plantas transgênicas, sendo mais expressivo na planta diploide. Em plantas transgênicas silenciadas assume-se menor atividade da *MIPS*, desta forma, acúmulo do substrato glicose-6P possibilitando o incremento em outras vias em que a glicose é substrato, como evidenciado nos teores de sacarose e no pool de glicose. A frutose por sua vez não é um açúcar de reserva em sementes de tomateiro, assim como a estaquiose, não sendo possível quantificá-las em sementes.

Assim como o *mio*-inositol, que não foi identificado em sementes. A síntese *de novo* de *mio*-inositol é reconhecida como a principal fonte de inositol em sementes, a qual envolve a conversão de glicose-6P em *mio*-inositol-1P pela ação da enzima MIPS1. O pool de *mio*-inositol é utilizado na produção e acumulação de AF ou inositol 1,2,3,4,5,6 hexafosfato ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) correspondendo de 60 a 95% do total de fósforo em sementes. O restante é apresentado em *mio*-inositol penta e tetraquifosfato (IP5 e IP4) e em menores quantidades, tri, di e monofosfato de *mio*-inositol (IP3, IP2 e IP) de maneira que um pool de inositol livre não é identificado (Ayet *et al.*, 1997).

A rafinose apresentou conteúdos distintos entre as plantas transgênicas, havendo acréscimo nas plantas MT 1 e MT 3, as plantas diploides MT 2 apresentaram conteúdos semelhantes com plantas-controle. Em plantas MT 1 mixoploides e MT 3 tetraploide houve acúmulo de rafinose, o que pode ser resposta à alteração na ploidia, em resposas

á sinais de estresse, visto que o acúmulo de rafinose é induzido por sinais de estresse (Kim *et al.*, 2008).

Os estresses estimulam a síntese de oligossacarídeos de rafinose (OR). Eles são sintetizados e armazenados em sementes para a aquisição de tolerância à dessecação e para proteção do embrião (Li *et al.*, 2011). Também podem atuar como moléculas de sinalização ao ataque de patógenos ou ferimentos (Cho *et al.*, 2010; Hatitatos *et al.*, 2000) ou em resposta a estresses abióticos (frio, salinidade, déficit hídrico e espécies reativas de oxigênio). Podem contribuir, ainda, para a estabilização de fosfolípidios de membrana durante a dessecação (Panikulangara *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2004; Taji *et al.*, 2002; Fowler e Thomashow, 2002; Amiard *et al.*, 2003; Nishizawa *et al.*, 2008). É interessante observar a possibilidade de alteração no conteúdo de OR em sementes de plantas possivelmente silenciadas e com a ploidia alterada, uma vez que esses são alvo do melhoramento genético na busca de diminuição do seu teor; essas alterações no genoma podem representar técnicas viáveis na manipulação dos conteúdos de oligossacarídeos de rafinose.

O *mio*-inositol-1-P é o substrato para síntese dos OR. A primeira reação é catalisada pela galactinol sintase (GOLS; EC 2.4.1.123) na transferência do resíduo de galactose da UDP-galactose para o inositol, formando o galactinol (Peterbauer e Richter, 2001; Liu *et al.*, 1995). O galactinol é o doador de resíduos de galactosil para a sacarose através de galactosiltransferases específicas na produção dos oligossacarídeos. O primeiro oligossacarídeo formado é a rafinose através da sintase da rafinose (EC 2.4.1.82). Outros oligossacarídeos (estaquiose, verbascose e ajucose) são formados sequencialmente incorporando unidades de galactosil. A via ROs está intimamente ligada ao metabolismo primário da planta através de *mio*-inositol, sacarose e UDP-galactose. A biossíntese de galactinol é controlada em nível de substrato (*mio*-inositol) e fatores de resposta ao estresse como verificado por Karner e colaboradores (2004).

Galactinol e ROs são compostos específicos de plantas, sem representantes em outros reinos. A evolução especializada da sintase do galactinol entre as plantas, sem haver registros anteriores, indica um importante papel deste grupo de compostos em plantas (Sengupta *et al.*, 2012).

A xilose é outro oligossacarídeo que pode ser influenciado pela alteração do conteúdo de *mio*-inositol. O conteúdo de xilose não foi reduzido, porém verificou-se acréscimo desse oligossacarídeo em plantas transgênicas, podendo ser em resposta ao

acúmulo de glicose e sacarose, uma vez que a síntese de xilose possui duas vias, podendo ser via UDP-glicose ou UDP-*mio*-inositol.

A biossíntese de xilose ocorre pela oxidação do MI livre pela *mio*-inositol oxigenase (MIOX) em ácido D-glucurônico (GlcA), que sequencialmente conduzem à formação de ácido UDP-glucurônico (UDP-GlcA); esse é o nucleotídeo de açúcar necessário para a síntese da parede celular durante o crescimento e desenvolvimento (Sharples e Fry, 2007). A via de catabolismo de inositol à ácido glucurônico é termodinamicamente irreversível (Endres e Tenhaken, 2009). Em adição à via MIOX, UDP-GlcA pode também ser produzido a partir de UDP-glicose por desidrogenase da UDP-glicose (UGD) (Klinghammer e Tenhaken, 2007).

Na biotecnologia aplicada à síntese de parede celular tem-se demonstrado que as reduções substanciais de um polímero resultam normalmente em fenótipos de crescimento indesejado ou compensação por outros polímeros (His *et al.*, 2001; Pena *et al.*, 2007; Persson *et al.*, 2007; Schillmiller *et al.*, 2009). E, ainda, indicaram que resultados mais efetivos na redução de parede celular são alcançados com a alteração de todos os genes ou perturbação na relação dos níveis de precursores dos diferentes polímeros da parede celular, alcançados, por exemplo, por alterações nos índices dos nucleotídeos de açúcar (Seifert, 2004; Sharples e Fry, 2007), mudanças essas previstas no pool do conteúdo metabólico (van der Merwe *et al.*, 2010).

A importância do conhecimento básico para a síntese da parede celular é buscada para maximizar a conversão de energia solar em biocombustíveis à base de etanol (Somerville, 2006; Carpita e McCann, 2008; Heaton *et al.*, 2008; Lopez-Casado *et al.*, 2008; Pauly e Keegstra, 2008; Yuan *et al.*, 2008; Carroll e Somerville, 2009). Os esforços atuais são focados na conversão da matriz lignocelulósica a etanol, melhorando a extração de moléculas baseadas em açúcar ou através da redução do polímero de lignina e polifenólicos (Carroll e Somerville, 2009). No entanto, apenas um sucesso limitado é obtido por meio de manipulações genéticas de enzimas diretamente associadas à parede celular e polímeros específicos (Pena *et al.*, 2007; Persson *et al.*, 2007; Schillmiller *et al.*, 2009).

Em folhas verificamos os menores conteúdos de inositol, possivelmente devido ao silenciamento. Dentre os sacarídeos analisados apenas sacarose e frutose foram detectados em folhas. Nota-se que em folhas os valores de sacarose e frutose contradizem o efeito esperado pelo silenciamento; porém, como folhas não são os órgãos de reserva desses metabólitos, a frutose, glicose e sacarose devem estar sendo

desviadas para as várias vias metabólicas, como a formação de UDP-glicose na síntese de parede celular, o que é determinante para o crescimento da planta, uma vez que o substrato principal de *mio*-inositol está com demanda inferior e ainda realocada para outras vias do metabolismo. Ainda, podemos inferir uma possível diminuição no metabolismo primário quando comparamos os valores das plantas-controle e transgênicos em folhas. O silenciamento ou o processo de transgenia pode ter afetado o metabolismo primário alterando a demanda metabólica nos transgênicos, o que é evidenciado pelo crescimento mais lento da parte aérea e produção de frutos diminuída em relação à planta-controle (dados não apresentados).

1.3.10 Teste de germinação, vigor germinativo e desenvolvimento de plântulas.

O vigor germinativo foi reduzido nas sementes de plantas transgênicas. As plantas-controle apresentaram germinação superior a 90%, enquanto em sementes provenientes de plantas transgênicas os valores variaram em torno de 20% de germinação ao quinto dia de avaliação. A mesma tendência foi encontrada no teste de germinação, no qual sementes provenientes de plantas transgênicas apresentaram germinação inferior às plantas-controle. Houve acréscimo em todos os tratamentos após o quinto dia até o décimo quarto dia, porém, a germinação das plantas transgênicas não se igualou a germinação das plantas-controle, não havendo recuperação do rendimento da germinação (Figura 9).

As sementes das plantas transgênicas não germinadas apresentaram intumescimento pela hidratação e algumas foram classificadas como mortas devido apresentarem início de deterioração.

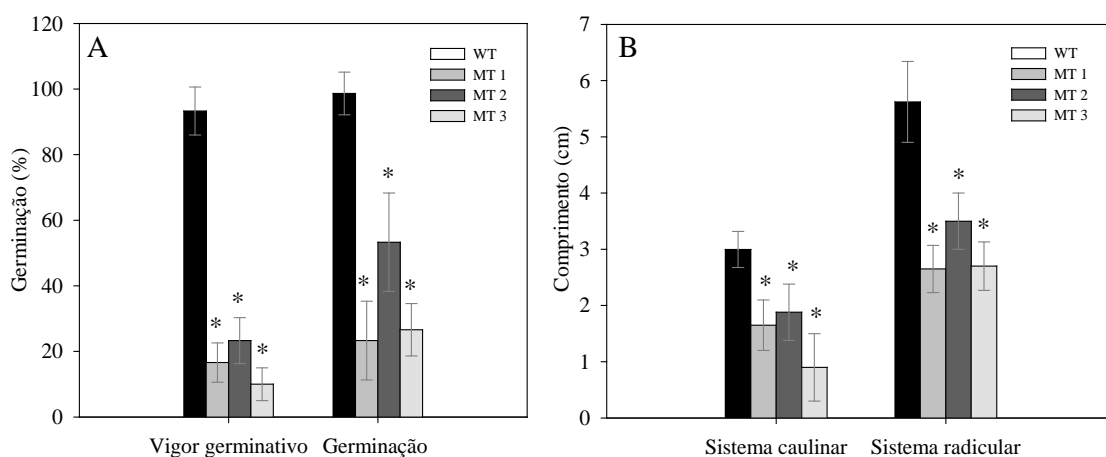


Figura 10. Vigor germinativo, germinação e desenvolvimento de plântulas em sementes de tomateiro. **A**- Vigor germinativo: sementes germinadas até o 5º dia, Germinação: sementes germinadas até o 14º dia. **B** Desenvolvimento de plântulas: avaliação do comprimento do sistema caular e radicular de plântulas normais com 14 dias de semeadura de plantas-controle e transgênicas (MT 1, MT 2 e MT 3) de tomateiro 'Moneymaker'. Asterisco indica diferença significativa em comparação com a planta-controle. Valores representam as médias \pm erro padrão (n = 3).

As sementes germinadas que se desenvolveram em plântulas normais foram avaliadas quanto à qualidade de plântulas. No décimo quarto dia de germinação verificou-se que as plântulas transgênicas tiveram o crescimento do hipocótilo e da radícula diminuído, quando comparado às plântulas-controle (Figura 9B).

Estes resultados demonstram que as sementes provenientes de plantas transgênicas possuem menor poder germinativo e menor vigor se comparadas às sementes provenientes de plantas-controle. Fato este que pode ter sido causado pela diminuição dos teores de fitato nas plântulas transgênicas, uma vez que o AF é digerido por fitases em sementes para a produção de fosfatos de inositol e inositol e liberação de cálcio e outros minerais divalentes, que auxiliam o crescimento de plântulas durante a fase de estabelecimento. De fato, reduções sistêmicas de AF usualmente têm efeitos negativos nas sementes, como comprometimento da germinação, emergência, tolerância ao estresse e preenchimento da semente (Raboy, 2007). A redução da expressão da *MIPS* também pode influenciar a via alternativa de produção de ascorbato que é um poderoso antioxidante e desempenha papel importante durante a germinação de sementes (Alimohammadi *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2012).

1.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho comprovam que sequências presentes em soja ou mesmo diferentes espécies, desde que apresentem alta homologia na espécie em estudo, podem ser utilizadas como indutores de silenciamento da expressão gênica, particularmente quando em construção que propicie a transcrição de segmentos *intron-hairpin-RNA*.

Ainda, as plantas transgênicas T₀ apresentaram alterações bioquímicas e morfológicas associadas a componentes e padrões morfológicos dependentes do conteúdo de *mio*-inositol, evidenciando, assim, a importância do conteúdo de *mio*-inositol ou expressão do gene *MIPS* nesses eventos. Cumpre mencionar que tanto a viabilidade quanto o desenvolvimento de sementes e frutos, bem como o potencial germinativo e conteúdos de ácido fítico e açúcares são influenciados diretamente em nível de substrato. Em síntese, a redução da expressão da *MIPS* apresenta-se como uma potencial estratégia de melhoramento ou manipulação do metabolismo vegetal.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Gawad AS. 1993. Effect of domestic processing on oligosaccharide content of some dry legume seeds. *Food Chemistry* 46: 25–31.

Abreu EFM, Aragão FJL. 2006. Isolation and characterization of a myo-inositol-1-phosphate synthase gene from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressed during seed development and environmental stress. *Annals of Botany* 99: 285–292

Afify AMR, El-Beltagi HS, Abd El-Salam SM, Orman AA. 2012. Biochemical changes in phenols, flavonoids, tannins, vitamin E, β -carotene and antioxidant activity during soaking of three white sorghum varieties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 203–209.

Alli I, Baker BE. 1981. Constitution of leguminous seeds. A note on protein-phytic acid interactions during isolation of acid-soluble protein from *Phaseolus* beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32:588-592.

Amiard V, Morvan-Bertrand A, Billard JP, Huault C, Keller F, Prud'homme MP. 2003. Fructans, but not the sucrosyl-galactosides, raffinose and loliose, are affected by drought stress in perennial ryegrass. *Plant Physiology* 132:2218–222

Ayet G, Burbano C, Cuadrado C, Pedrosa MM, Robredo LM, Muzquiz M, Delacuadra C, Castano A, Osagie A. 1997. Effect of germination under different environmental conditions on saponins, phytic acid and tannis in lentils (*len culinares*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 74:273-279.

Bilgiçli N. 2009. Effects of cooking and drying processes on physical, chemical and sensory properties of legume based bulgur. *Journal of Food Processing and Preservation* 33:590–604.

Bilgiçli N, Elgün A, Türker S. 2006. Effects of various phytase sources on phytic acid content, mineral extractability and protein digestibility of tarhana. *Food Chemistry* 98:329–337.

Bohn L, Meyer AS, Rasmussen SK. 2008. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University of Science* 3:165–191.

Bollini R, Carnovale E, Campion B. 1999. Removal of antinutritional factors from bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Biotechnology Agronomy Society and Environment* 4:217–219.

Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: Mapa/ACS, 399 p

Brearley CA, Hanke DE. 1996. Metabolic evidence for the order of addition of individual phosphate esters to the myo-inositol moiety of inositol hexakisphosphate in the duckweed *Spirodela polyrriza* L. *Biochemistry Journal* 314:227-233.

Brinch-Pedersen H, Sørensen LD, Holm PB. 2002. Engineering crop plants: getting a handle on phosphate. *Trends in Plant Science* 7:118-125.

Buerkert A, Haake C, Ruckwied M, Marschener H. 2001. Phosphorus application affects the nutritional quality of millet grain in the sahel. *Field Crops Research* 57:223-235.

Carpita NCC, McCann MC. 2008. Maize and sorghum: genetic resources for bioenergy grasses. *Trends in Plant Science* 13:415-420.

Carroll A, Somerville C. 2009. Cellulosic biofuels. *Annual Review of Plant Biology* 60:165-182.

Chang R. 1977. Phytate: removal from whole dry beans by enzymatic hydrolysis and diffusion. *Journal of Food Science* 42:1098-1101.

Chaudhry Z, Rashid H. 2010. An improved *Agrobacterium* mediated transformation in tomato using hygromycin as a selective agent. *African Journal of Biotechnology* 9:1882-1891.

Cheryan M. 1980. Phytic acid interactions in food systems. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 13:297-336.

Cho SM, Kang EY, Kim MS, Yoo SJ, Im YJ, Kim YC, Yang KY, Kim KY, Kim KS, Choi YS, Cho BH. 2010. Jasmonate-dependent expression of a galactinol synthase gene is involved in priming of systemic fungal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Botany* 88:452-461.

Chun JA, Jin UH, Lee JW, Yi YB, Hyung NI, Kang MH, Pyee JH, Suh MC, Kang C W, Seo HY, Lee SW, Chung CH. 2003. Isolation and characterization of a myo-inositol 1-phosphate synthase cDNA from developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds: functional and differential expression, and salt-induced transcription during germination. *Planta* 216:874-880.

Costa MGC, Guimarães LMS, Guimarães GAM, Nogueira FTS, Otoni WC. 2007. Transformação genética de tomateiro. In: Torres AC, Dusi AN, Santos MDM (Eds.). *Transformação genética de plantas: teoria e prática*. Brasília: Embrapa Hortaliças. p. 145-161.

Doležel J, Bartos J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* 95:99-110.

Edwards K, Johnstone C, Thompson C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19:1349.

Ellu P, Garcia-Sogo B, Pineda B, Ríos G, Roig LA, Moreno V. 2003. The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theoretical and Applied Genetics* 10:231-238.

Endres S, Tenhaken R. 2009. Myoinositol oxygenase controls the level of myo-inositol in *Arabidopsis*, but does not increase ascorbic acid. *Plant Physiology* 149:1042–1049.

Ertuş N, Türker S. 2012. Bulgur processes increase nutrition value: possible rol in-vitro protein digestability, phytic acid, trypsin inhibitor activity and mineral bioavailability. *Journal of Food Science and Technology*. doi:10.1007/s13197-012-0638-7.

Evans DA, Sharp WR, Medina-Filho HP. 1984. Somaclonal and gametoclonal variation. *American Journal of Botany* 77:759–774.

Fowler S, Thomashow MF. 2002. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* 14:1675–1690.

Frias J, Díaz-Pollán C, Hedley CL, Vidal-Valverde C. 1996. Evolution and kinetics of monosaccharide, disaccharide and α -galactosides during germination of lentils. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung* 202:35–39.

Frias J, Vidal-Valverde C, Sotomayor C, Díaz-Pollán C, Urbano G. 2000. Influence of processing on available carbohydrate content and antinutritional factors of chickpeas. *European Food Research Technology* 210:340–345.

Glahn RP, Cheng Z, Welch RM. 2002. Comparison of iron bioavailability from 15 rice genotypes: studies using an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:3586–3591.

Goyoaga C, Burbano C, Cuadrado C, Romero C, Guillamón E, Varela A, Pedrosa MM, Muzquiz M. 2011. Content and distribution of protein, sugars and inositol phosphates during the germination and seedling growth of two cultivars of *Vicia faba*. *Journal of Food Composition and Analysis* 24:391–397.

Graf E. 1983. Applications of phytic acid. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 60:1861-1867.

Grases F, Isern B, Sanchis P, Perello J, Torres JJ, Costa-Bauza A. 2007. Phytate acts as an inhibitor in formation of renal calculi. *Frontiers in Bioscience* 12:2580–2587.

Guimarães VM, Rezende ST, Moreira MA, Barros EG, Felix CR. 2001. Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. *Phytochemistry* 58:67–73

Harland BF, Morris ER. 1995. Phytate: A good or bad food component? *Nutrition Research* 15:733–754.

Hatitatos A, Ayre GB, Turgeon R. 2000. Identification of phloem involved in assimilate loading in leaves by the activity of the galactinol synthase promoter. *Plant Physiology* 123:929–938.

Haug W, Lantsch HJ. 1983. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *Journal of the Science of Food Agriculture* 34:1423-1426.

Heaton EA, Flavell RB, Mascia PN, Thomas SR, Doehleman FG, Long SP. 2008. Herbaceous energy crop development: recent progress and future prospects. *Current Opinion in Plant Biotechnology* 19:202–209.

Hegeman CE, Good LL, Grabau EA. 2001. Expression of D-*myo*-inositol-3-phosphate syntase in soybean. Implications for phytic acid biosynthesis. *Plant Physiology* 125:1941-1948.

His I, Driouich A, Nicol F, Jauneau A, Hofte H. 2001. Altered pectin composition in primary cell walls of korrgan, a dwarf mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in membrane-bound endo-1,4-beta-glucanase. *Planta* 212:348–358.

Hiscox JD, Israelstam GF. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany* 57:1332- 1334.

Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The Water-Cultured Method for Growing without Soil. Circular n° 347. *California Agricultural Experiment Station*. 32 p.

Horbowicz M, Obendorf RL. 1994. Seed desiccation tolerance and storability: dependence of flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols. Review and survey. *Seed Science Research* 4:385–405.

Jefferson RA. 1987. Assaying chimeric genes in plant: the *GUS* gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reports* 5:387-405.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. 1987. GUS fusion:β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6:3001-3907.

Jood SU, Mehta R, Singh, Bhat CM. 1985. Effect of processing on latus producing factors in legumes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 33:268–271.

Karner U, Peterbauer T, Raboy V, Jones DA, Hedley CL, Richter A. 2004. Myo-inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds. *Journal of Experimental Botany* 55:1981–1987.

Karp A. 1991 On the current understanding of somaclonal variation. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology* 7:1–58.

Kim MS, Cho SM, Kang EY, Im YJ, Hwangbo H, Kim YC, Ryu CM, Yang KY, Chung GC, Cho BH. 2008. Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 root colonization. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 21:1643–1653

- Klinghammer M, Tenhaken R. 2007. Genome-wide analysis of the UDP-glucose dehydrogenase gene family in Arabidopsis, a key enzyme for matrix polysaccharides in cell walls. *Journal of Experimental Botany* 58:3609–3621.
- Knuckles BE, Kuzmicky DD, Betschart AA. 1985. Effect of phytate and partially hydrolyzed phytate on in vitro protein digestibility. *Journal of Food Science* 50:1080-1082.
- Kunze M, Riedel J, Lange U, Hurwitz R, Tischner R. 1997. Evidence for the presence of GPI-anchored PMNR in leaves of *Beta vulgaris* and from PM-NR in barley leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 35:507–512.
- Larkin PJ, Scowcroft WR. 1981. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60:443-455.
- Li P, Wind JJ, Shi X, Zhang H, Hanson J, Smeekens SC, Teng S. 2011. Fructose sensitivity is suppressed in Arabidopsis by the transcription factor NAC089 lacking the membrane-bound domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 108: 3436–3444.
- Liu JJ, Odegard W, de Lumen BO. 1995. Galactinol synthase from kidney bean cotyledon and zucchini leaf – purification and N-terminal sequences. *Plant Physiology* 109:505–5.
- Loewus FA, Murthy PPN. 2000. *myo*-Inositol metabolism in plants. *Plant Science* 150:1–19.
- Loewus FA, Stanley K, Neufeld EF. 1962. Metabolism of *myo*-inositol in plants: conversion to pectin, hemicellulose, D-xylose, and sugar acids. *Biochemistry* 48:421-425.
- Loewus FA, Jang R, Seegmiller CG. 1958. The conversion of C¹⁴-labeled sugars to l-ascorbic acid in ripening strawberries: IV. Comparative study of d-galacturonic acid and l-ascorbic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 232-533.
- Loewus FA, Loewus MW. 1983. *myo*-Inositol: its biosynthesis and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* 34:137-161.
- Lopez-Casado G, Urbanowicz BR, Damasceno CMB, Rose JKC. 2008. Plant glycosyl hydrolases and biofuels: a natural marriage. *Current Opinion in Plant Biology* 11:329–337.
- Lott JNA. 2000. Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: a global estimate. *Seed Science Research* 10:11–33.
- Lott JNA, Greenwood JS, Batten GD. 1995. Mechanisms and regulation of mineral nutrient storage during seed development. In: Kigel J and Galili G. (eds) *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker, New York, 215–235.

- Loureiro J, Pinto G, Lopes T, Doležel J, Santos C. 2005. Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. *Planta* 221:815–822.
- Lumen BO. 1992. Molecular strategies to improve protein quality and reduced flatulence in legumes: A review. *Food Structure* 11:33-46.
- Ma Y, Lin SQ, Gao Y, Li M, Luo WX, Zhang J, Xia NS. 2003. Expression of *ORF2* partial gene of hepatitis E virus in tomatoes and immunoactivity of expression products. *World Journal of Gastroenterology* 9:2211-2215.
- Majumder AL, Johnson MD, Henry SA. 1997. 1L-myoInositol-1-phosphate synthase. *Biochimica Biophysica Acta* 1348:245–25.
- Mansour EH, Khalil AH. 1998. Reduction of raffinose oligosaccharides in chickpea (*Cicer arietinum*) 1 hour by crude extracellular fungal α -galactosidase. *Journal of Food Science and Agriculture* 78:175–181.
- Messina M, Barnes S. 1991. The role of soy products in reducing risk of cancer. *Journal of National Cancer Institute* 83:541-546.
- Morita N, Nakazato H, Okuyama H, Kim Y, Thompson GA. 1996. Evidence for a glycosylinositolphospholipid-anchored alkaline phosphatase in the aquatic plant *Spirodela oligorrhiza*. *Biochemical Biophysica Acta* 1290:3–62.
- Morré DJ, Boss WF, Loewus FA. 1990. *Inositol Metabolism in Plants*. (Eds.) Wiley–Liss, New York, p 393.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Nakagawa J. 1999. Testes de vigor baseados no desenvolvimento das plântulas. In: Krzyzanowski FC, Vieira RD, França-Neto JB. *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina: ABRATES 2:1-24.
- Nakazato H, Okamoto T, Nishikoori M, Washio K, Morita N, Haraguchi K, Thompson Jr GA, Okuyama H. 1998. The glycosylphosphatidylinositol-anchored phosphatase from *Spirodela oligorrhiza* is a purple acid phosphatase. *Plant Physiology* 118:1015–1020.
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S. 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology* 147:1251–1263.
- Nitsch JP. 1969. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology* 19:389-404.
- Nunes A, Vianna G, Cuneo F, Amaya-Farfán J, Capdeville G, Rech E, Aragão F. 2006. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPSI*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta* 224:125-132.

Oliveira MLP, Febres VJ, Costa MGC, Moore GA, Otoni WC. 2009. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports* 28:387-395.

Orbović V, Calović M, Vilorija Z, Nielsen B, Gmitter Jr FG, Castle WS, Grosser JW. 2008. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica* 161:329–335.

Otoni WC, Picoli EAT, Costa MGC, Nogueira FTS, Zerbini FM. 2003. Transgenic tomato. In: Singh, R.P.; Jaiwal, P. J. (Eds.) *Plant genetic engineering: Improvement of vegetables*, Houston:Sci Tech Publishing LLC 5:40-131.

Palauqui JC, Elmayan JM, Vaucheret H. 1997. Systemic acquired silencing: Transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO Journal* 16:4738-45.

Panikulangara TJ, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, Stransky H, Schöffl F. 2004. Galactinol synthase 1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in Arabidopsis. *Plant Physiology* 136:3148–3158.

Pauly M, Keegstra K. 2008. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant Journal* 54:559–568.

Pena MJ, Zhong RQ, Zhou GK, Richardson EA, O’Neil MA, Darvill AG, York WS, Ye ZH. 2007. Arabidopsis irregular xylem8 and irregular xylem9: implications for the complexity of glucuronoxylan biosynthesis. *Plant Cell* 19:549–562.

Persson S, Caffall KH, Freshour G, Hilley MT, Bauer S, Poindexter P, Hahn MG, Mohnen D, Somerville C. 2007. The Arabidopsis irregular xylem8 mutant is deficient in glucuronoxylan and homogalacturonan, which are essential for secondary cell wall integrity. *Plant Cell* 19:237–255.

Peterbauer T, Richter A. 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11:185–197.

Peterbauer T, Richter A. 1998. Galactosylononitol and stachyose synthesis in seeds of adzuki bean: purification and characterization of stachyose synthase. *Plant Physiology* 117:165–172

Picoli EAT, Ribeiro APO, Otoni WC. 2007. Transformação genética de berinjela. In: Torres, A. C.; Dusi, A. N.; Santos, M. D. M. (Eds.). *Transformação genética de plantas: teoria e prática*. Brasília: Embrapa Hortaliças 165-177.

Raboy V, Noaman MM, Taylor GA, Pickett SG. 1991. Grain phytic acid and protein are highly correlated in winter wheat. *Crop Science* 31:631–635

Raboy V. 2000. Genetics and breeding of seed phosphorus and phytic acid. *Journal of Plant Physiology* 158:489–494

Raboy V, Dickinson DB. 1993. Phytic acid levels in seeds of *Glycine max.* and *G. soja* as influenced by phosphorus status. *Crop Science* 33:1300-1305.

Raboy V, Young KA, Larson SR, Cook A. 2002. Genetics of phytic acid synthesis and accumulation. In: Reddy, N.R.; Sathé, S.K. (eds). *Food Phytates*. CRC Press, Boca Raton, FL 63–83.

Reddy NR, Pierson MD, Sathé SK, Salunkhe DK. 1989. *Phytates in cereals and legumes*. CRC, Boca Raton.

Roy R, Purty RS, Agrawal V, Gupta SC. 2006. Transformation of tomato cultivar ‘Pusa Ruby’ with bspA gene from *Populus tremula* for drought tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84:56-67.

Salunke DK, Kadam SS. 2000. Fermentation: Nutritional, chemistry, processing technology and utilization. In: *CRC Handbook of World Food Legumes: Vol. III*, CRC Press, Inc., BocaRaton, FL 177–217.

Schillmiller AL, Stout J, Weng JK, Humphreys J, Ruegger MO, Chapple C. 2009. Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, growth and development in Arabidopsis. *Plant Journal* 60:771–782

Seifert GJ. 2004. Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. *Current Opinion in Plant Biology* 7:277–283.

Sengupta S, Mukherjee S, Parween S, Majumder AL. 2012. Galactinol synthase across evolutionary diverse taxa: Functional preference for higher plants? *FEBS Letters* 586:1488–1496.

Serraino MR, Thompson LU, Savoie L, Parent G. 1985. Effect of phytic acid on the in-vitro rate of digestibility of rapeseed protein and amino acids. *Journal of Food Science* 50:1689-1692.

Sharples SC, Fry SC. 2007. Radioisotope ratios discriminate between competing pathways of cell wall polysaccharide and RNA biosynthesis in living plant cells. *Plant Journal* 52:252–262.

Singh M, Krikorian AD. 1982. Inhibition of trypsin activity in vitro by phytate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30:799-800.

Singh RP, Agarwal R. 2005. Prostate cancer and inositol hexaphosphate: efficacy and mechanisms. *Anticancer Research* 25:2891–2904.

Somerville C. 2006. The billion-ton biofuels vision. *Science* 312:1277.

Song G, Walworth A, Hancock JF. 2012. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of switchgrass cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108:445–453

- Steggerda FR, Dimmick JF. 1966. Effect of bean diet on concentration of carbon Dioxide in flatus. *American Journal of Clinical Nutrition* 19:120-124.
- Stohr C, Schuler F, Tischner R. 1995. Glycosyl-phosphatidylinositol- anchored proteins exist in the plasma membranes of *Chlorella Saccharophila* (Kruger) Nadson: Plasma-membrane-bound nitrate reductase. *Planta* 196:284–287.
- Suarez FL, Springfield J, Furn J K, Lohrmann TT, Kerr PS, Levett MD. 1999. Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from Beans naturally low in oligosaccharides. *American Journal of Clinical Nutrition* 69:135-139.
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2002. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 29:417–26.
- Urbano GM, López-Jurado M, Hernández MC, Moreu J, Frias C, Díaz-Pollán M, Prodanov C, Vidal-Valverde. 1995. Nutritional assessment of raw, heated, and germinated lentils. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry* 43:1871–1877.
- Vaintraub IA, Bulmaga VP. 1991. Effect of phytate on the in vitro activity of digestive proteinases. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry* 39:859-861.
- van der Merwe MJ, Osorio S, Moritz T, Nunes-Nesi A, Fernie AR. 2009. Decreased mitochondrial activities of malate dehydrogenase and fumarase in *Solanum lycopersicum* lead to altered root growth and architecture via diverse mechanisms. *Plant Physiology* 149:653–669.
- Vucenik I, Shamsuddin AM. 2006. Protection against cancer by dietary IP6 and inositol. *Nutrition and Cancer* 55:109–125.
- Wagner JR, Becker R, Gunbmann R, Olson AC. 1976. Hydrogen production in the rat following ingestion of raffinose, stachyose and oligosaccharide-free bean residue. *Journal of Nutrition* 106: 466-470.
- Welch RM, Graham RD. 2004. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany* 55:353–36.
- Wellburn AR. 1994. The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144:307-313.
- Yuan JS, Tiller KH, Al-Ahmad H, Stewart NR, Stewart CN. 2008. Plants to power: bioenergy to fuel the future. *Trends in Plant Science* 13:421–429.
- Zhao TY, Martin D, Meeley RB, Downie B. 2004. Expression of the maize galactinol synthase gene family: (II) Kernel abscission, environmental stress and myo-inositol influences accumulation of transcript in developing seeds and callus cells. *Physiologia Plantarum* 121:647–655.

CAPÍTULO 2

O silenciamento do gene da *mio*-inositol-fostato sintase (*MIPS1*) mediado por RNAi em tomateiro (*Solanum lycopersicum* Mill.) influencia o acúmulo de ácido fítico, de açúcares, o desenvolvimento de frutos, a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas

2.1 INTRODUÇÃO

A enzima *mio*-inositol fosfato sintase (*MIPSI*) (E.C.5.5.1.4) catalisa a conversão irreversível de D-Glicose-6-P para 1-L-*mio*-inositol-1-P. O seu produto, o *mio*-inositol está presente em várias vias metabólicas onde o anel de inositol é requerido. Essa é a única via de biossíntese *de novo*, sendo encontrada em cianobactérias, algas, fungos e plantas e possui papel central no metabolismo celular (Loewus e Loewus, 1983; Morré *et al.*, 1990; Majumder, 1997). O *mio*-inositol é um importante metabólito celular necessário para o crescimento e desenvolvimento de vegetais (Stevenson *et al.*, 2000; Valluru e Ende, 2011). Contribui, ainda, na proteção contra salinidade, restaurando a pressão de turgescência e proteção de estruturas celulares ao estresse de espécies reativas de oxigênio (Loewus e Murthy, 2000; Majumder e Biswas, 2006).

Em plantas, o *mio*-inositol ocupa papel de destaque no metabolismo de inositol, fornecendo inositol e inositídeos envolvidos em processos metabólicos e em estruturas vegetativas (Goya *et al.*, 2011; Valluru e Ende, 2011). O *mio*-inositol pode ser usado para produzir o fosfatidilinositol (PtdIns) e os seus derivados (Scherer, 1850) polifosfatos Ins (Kersting *et al.*, 2003) e solutos compatíveis tais como galactinol, rafinose, família oligossacarídeos (OR), polissacarídeos de parede celular e pinitol (Dastidar *et al.*, 2006). Estes compostos derivados de *mio*-inositol participam de funções celulares cruciais em plantas como na transdução de sinais (Stevenson *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2007), tráfego de membranas (Thole e Nielsen, 2008), exportação de mRNA (Okada e Ye, 2009), tolerância a estresse (Shevelava *et al.*, 1997) e armazenamento de fósforo (Thole e Nielsen, 2008; Stevenson-Paulik *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2008). Além disso, o *mio*-inositol é produto primário do ácido D-glucurônico, utilizado na síntese de uma variedade de substâncias pécticas da parede celular e os compostos não celulósicos e ácido ascórbico (Loewus e Murthy, 2000; Sasaki *et al.*, 1989; Lorence *et al.*, 2004).

Dentre as vias nas quais o inositol está envolvido, algumas são alvo do melhoramento vegetal, dentre elas: a manipulação do conteúdo de ácido fítico em sementes (Raboy, 2000; Brinch-Pedersen *et al.*, 2002; Ali *et al.*; 2013) de oligossacarídeos de rafinose em sementes (Raboy, 2007) e açúcares estruturais na parede celular (Carroll e Somerville, 2009).

O ácido fítico é uma molécula constituída por um anel de *mio*-inositol, seis grupamentos fosfato. A eletronegatividade dos grupamentos fosfato possibilita ligações

com cátions de minerais divalentes formando um composto salino misto chamado de fitato (Lott *et al.*, 1995). O fitato se acumula em sementes e é considerado o maior recurso de fósforo, fosfato de inositol e minerais durante a germinação e estabelecimento das plântulas (Abreu e Aragão, 2007; Wongkaew *et al.*, 2010). Estudos buscam reduzir o conteúdo de fitato em sementes devido sua indigestibilidade pela falta da enzima fitase em animais monogástricos (Bregitzer e Raboy, 2007), sua redução resulta no fornecimento de fósforo e cátions divalentes como Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e Ca^{2+} , que estão quelados na molécula de ácido fítico. A redução de fitato em sementes também contribui na redução de descarte de poluentes fosforados em dejetos de animais, esse descarte representa a maior fonte de despejo de fósforo no meio-ambiente pela agroindústria (Reynolds e Davies, 2001; Brinch-Pedersen *et al.*, 2002; Raboy, 2007).

A manipulação da via visando à redução do conteúdo de ácido fítico em plantas tem sido conduzida mediante a inserção de fitases (Chierra *et al.*, 2004; Bilyeu *et al.*, 2008); a seleção de mutantes com baixo teor de ácido fítico em milho (Raboy, 2000, Shi *et al.*, 2003), cevada (Larson *et al.*, 1998), arroz (Larson *et al.*, 2000; Raboy, 2007), em soja (Wilcox *et al.*, 2000) e feijoeiro comum (Campion *et al.*, 2009); silenciamento de genes promotores em milho (Shi *et al.*, 2007; Raboy, 2007); e pelo silenciamento da *MIPS* em batata (Keller *et al.*, 1998; Abid *et al.*, 2009), soja (Nunes *et al.*, 2006), tomate (Fernandes, 2009) e arroz (Ali *et al.*, 2013).

Os oligossacarídeos de rafinose (OR) são sintetizados e armazenados em sementes para a aquisição de tolerância à dessecação e proteção do embrião (Li *et al.*, 2011). Também, podem atuar como molécula de sinalização ao ataque de patógenos ou ferimentos e resposta a estresses abióticos (Hatitatos *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2010). Podem contribuir, ainda, para a estabilização de fosfolipídios de membrana durante a dessecação (Nishizawa *et al.*, 2008). Mas são alvo do melhoramento vegetal devido a mucosa do intestino delgado de humanos e animais monogástricos como aves e suínos ser desprovida de α -1,6-galactosidases e α -D-galactosil galactohidrolases, enzimas necessárias à conversão dos OR em açúcares mais simples. Conseqüentemente, 100% dos OR não são degradados e são conduzidos ao intestino grosso, onde bactérias anaeróbicas possuem os sistemas enzimáticos necessários para fermentação desses açúcares, o que resulta em liberação de grandes quantidades de CO_2 , H_2 e CH_4 (Suarez *et al.*, 1999).

O *mio*-inositol é necessário na síntese de xilose, pectinas e hemicelulose, a importância do conhecimento básico da síntese da parede celular auxilia programas de melhoramento que buscam maximizar a conversão de energia solar em biocombustíveis à base de etanol (Carpita e McCann, 2008; Heaton *et al.*, 2008; Lopez-Casado *et al.*, 2008; Pauly e Keegstra, 2008; Yuan *et al.*, 2008). Os esforços estão focados na conversão da matriz lignocelulósica a etanol, melhorando a extração de moléculas baseadas em açúcares ou por redução do polímero de lignina e polifenólicos (Carroll e Somerville, 2009).

A textura dos frutos, especialmente o amolecimento durante o amadurecimento é atributo desejável para consumo humano. No entanto, também está associada com a redução da vida útil pós-colheita e aumento da susceptibilidade à infecção microbiana. Devido à importância econômica, há um interesse significativo na compreensão dos mecanismos bioquímicos que regulam o processo das mudanças da textura da fruta. O amolecimento ocorrido na maturação do fruto geralmente envolve modificações nos polissacarídeos e proteínas componentes da parede celular primária e lamela média, resultando em um enfraquecimento da estrutura (Brummell, 2006; Vicente *et al.*, 2007; Negi e Handa, 2008)

O silenciamento da *mio*-inositol-fosfato sintase ao reduzir o conteúdo de *mio*-inositol, teoricamente, pode intervir nas vias de biossíntese de ácido fítico, oligossacarídeos e compostos pécnicos. No entanto, elevados níveis de silenciamento podem comprometer a homeostase e manutenção de processos fisiológicos e reprodutivos resultando em alterações não esperadas e desvantajosas nas cultivares silenciadas (Keller *et al.*, 1998; Nunes *et al.*, 2006; Fernandes, 2009, Donahue *et al.*, 2010).

Nesse estudo, plantas e frutos da progênie T₁ em cinco diferentes níveis de silenciamento da *MIPSI* e sementes e plântulas T₂ foram avaliadas quanto o conteúdo de fitatos, açúcares e parâmetros físico-morfológicos.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Obtenção de material vegetal

Sementes T₁ de plantas de tomateiro ‘Moneymaker’ transgênico MT 2 contendo construção tipo *intron-hairpin-RNA* com fragmentos do gene *MIPS* de *Glycine max* ($\Delta GmMIPS$) (Figura 1) indutora de silenciamento da sintase do *mio*-inositol-fosfato, de origem do vetor de transformação pMIPS1303 inserido na *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 (Figura 2), foram desinfetadas em imersão em etanol 70% por 1 minuto, seguido por 20 minutos em solução de NaClO a 1,25 % de cloro ativo e enxágue em água deionizada estéril por três vezes sob condições asséptica. As sementes desinfetadas foram cultivadas em meio MS (Murashige e Skoog 1962) meia-força, vitaminas de Nitsch (Nitsch e Nitsch, 1969), 20 g L⁻¹ sacarose, 0,1 g L⁻¹ de *mio*-inositol, 6,5 g L⁻¹ de ágar Merck[®] e pH 5.8 ± 0.1.

As culturas foram mantidas sob irradiância de 24 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 26 ± 2 °C. Quinze dias após a germinação, as plântulas foram transferidas em recipientes plásticos de 300 mL de capacidade, contendo substrato Plantmax[®] (DDL Agro Indústria Ltda), cobertas por embalagem plástica. A diminuição da umidade foi realizada gradativamente com perfurações na embalagem plástica de cobertura durante duas semanas e então retirada a embalagem e transferência das plântulas para sistema hidropônico individual em caixas de isopor de 5 litros de capacidade contendo o meio de cultivo Hoagland e Arnon (1950) meia força em casa-de-vegetação. Após a confirmação do transgene e do silenciamento da *MIPS*, cinco linhagens selecionadas foram multiplicadas por enraizamento lateral em cinco replicatas para a montagem do experimento.

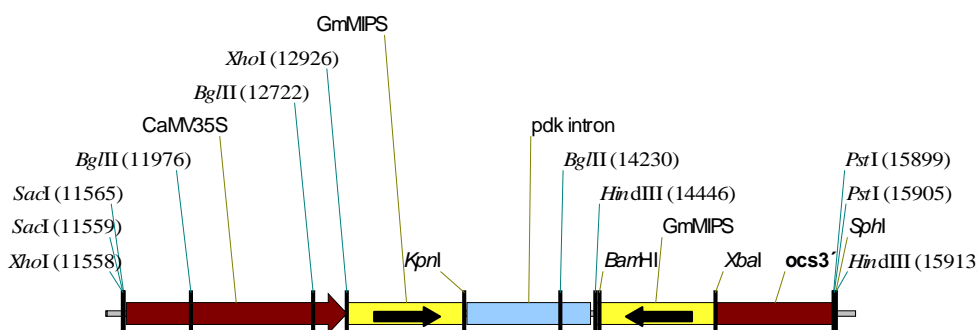


Figura 1. Detalhe do vetor de transformação: sequência indutora de *intron-hairpin-RNA* constituída de promotor *CaMV 35S*, seguido por fragmento de *GmMIPS* no sentido senso, *pdk* intron, repetição antissenso do fragmento de *GmMIPS* e *ocs* terminator.

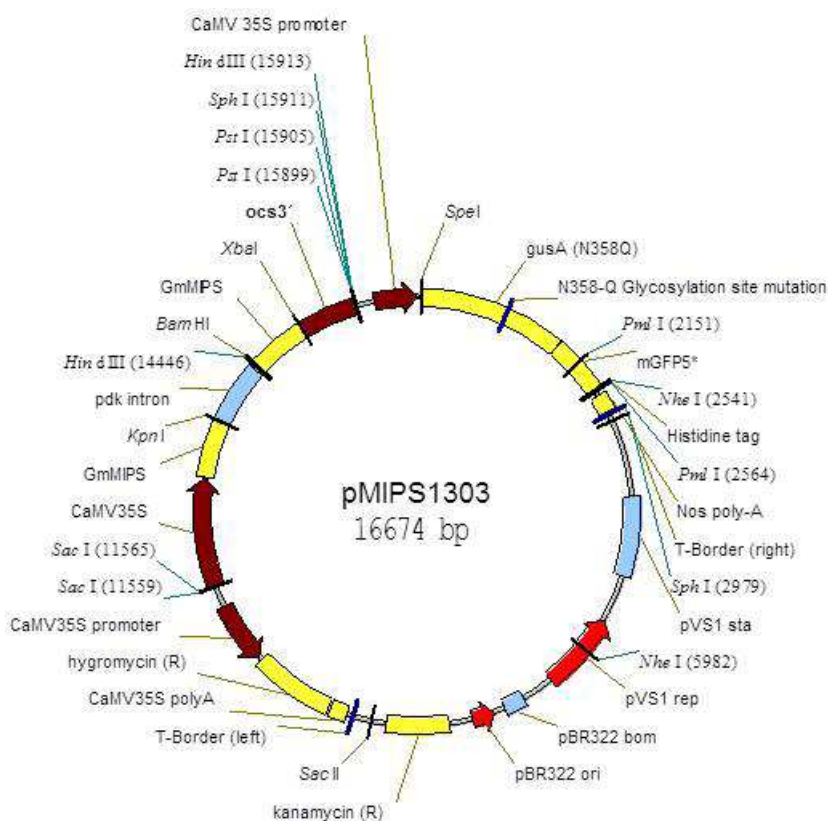


Figura 2. Vetor de transformação pMIPS1303 inserido na *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101.

2.2.2 Confirmação da integração do transgene por reação da polimerase em cadeia (PCR)

A análise de PCR ocorreu com DNA isolado de discos foliares de acordo com o método CTAB (Doyle e Doyle, 1990). A reação de PCR foi realizada em termociclador (PTC-100, MJ Researcher, USA) com 50 μ L de solução contendo 40 ng de DNA, 60 mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 250 nM de cada dNTP; 200 nM de cada iniciador, 5 U de Taq polimerase (Invitrogen). A reação foi conduzida a 95 °C (5 min) com 35 ciclos de amplificação (95 °C durante 1 min, 50 °C durante 1 min, 72 °C durante 1 min) e ciclo de alongamento final a 72 °C durante 5 min.

Os iniciadores específicos para o gene de tolerância a higromicina: ‘forward’ 5' GCTCCATAACAAGCCAACCAC-3' e ‘reverse’ 5'-CGAAAAGTTCGACAGCGTCTC-3' foram utilizados para amplificar um fragmento a partir de DNA genômico de 670 pb. O DNA amplificado foi detectado no gel de agarose a 0.8% em solução contendo brometo de etídio 10 mg mL⁻¹. Os produtos da PCR foram visualizados colocando o gel no transiluminador UV e fotografados em sistema de documentação.

2.2.3 Desenho e teste dos oligonucleotídeos para realização da PCR quantitativa de transcrição reversa (RT-qPCR)

Sequência da *MIPSI* GenBank No. AI491091 com expressão em folhas de tomateiro foi utilizada como molde para desenhar os oligonucleotídeos para RT-qPCR. O software PrimerExpress 2.0 (Applied Biosystems) projetou os oligonucleotídeos com os seguintes critérios: temperatura de anelamento de 55 a 62 °C, comprimento do fragmento amplificado de 70 a 150 pb, comprimento dos oligonucleotídeos de 18 a 25 nucleotídeos e conteúdo guanina-citosina de 40 a 60%.

Quatro genes constitutivos com expressão supostamente inalterada com o silenciamento da *MIPSI* foram testados a fim de determinar a referência interna para a normalização da expressão do gene. Os genes testados foram: actina (BT013524), β -6-tubulina (BT013153), fator de alongamento-1 α (BT013246), e adenina fosforibosiltransferase (APT1) (BT012816) (Alfenas-Zerbini, 2009).

A especificidade das quatro sequências *MIPSI* foi verificada na base de dados do NCBI utilizando o Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A especificidade de amplificação dos oligonucleotídeos *MIPSI* desenhados e normalizadores foi verificada por meio da análise das curvas de dissociação e por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% revelado com nitrato de prata. O oligonucleotídeo de *MIPSI* e normalizador que apresentou banda única e expressiva de plantas-controle e transgênicas de tomateiro foi escolhido para a RT-qPCR.

2.2.4 Análise da expressão do gene *MIPSI* por RT-qPCR

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de tecido foliar com o Plant RNA Reagent Invitrogen[®] de acordo com as especificações do fabricante. Após extração, o RNA foi tratado com DNase I Promega[®] e quantificado em aparelho NanoDrop ND-1000 para ajustar a concentração em 250 ng μL^{-1} . O cDNA foi sintetizado a partir de 2 μg de RNA com o uso de transcriptase reversa SuperScript[®] III (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com as especificações do fabricante.

A reação de RT-qPCR foi realizada em placa óptica de 96 poços em aparelho ABI7500 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando o SYBR Green para monitorar a síntese de dsDNA. As reações contiveram 6 μL SYBR Green Master Mix reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 1 μL de cDNA, 300 nM de cada oligonucleotídeo em volume final de 12 μL . As amplificações

ocorreram em 50 °C por 2 minutos, 95 °C 10 por minutos e 39 ciclos de 95 °C a 15s e 60 °C a 1 minuto. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

Os oligonucleotídeos utilizados para a RT-qPCR foram o MIPS1-4 'forward' (5'-TGAAGGAGAGGGTAAGTTCCA-3') e MIPS1-4 'reverse' (5'-AAAGGAGCCTTGGTAA GATAACTG-3') para verificar a expressão da *MIPS1* e o APT1 'forward' (5'-CCATGAGGAAACCCAAGAAGT-3') e APT1 'reverse' (5'-CCTCCAGTCGCAATTAGATCAT-3') para verificar a expressão do gene *APT1*. Os níveis de expressão foram normalizados em relação ao gene *APT1* e a quantificação relativa para *MIPS1* foi realizada pelo método comparativo de C_T ($\Delta\Delta CT$) (Livak e Schmittgen 2001).

2.2.5 Quantificação de pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos foram extraídos de três discos foliares de 0,8 cm de folhas do terceiro entrenó de cinco réplicas por tratamento, utilizando DMSO saturado com carbonato de cálcio durante 48 horas em temperatura ambiente e protegido de luminosidade (Hiscox e Israeltam, 1979). O extrato foi mensurado em espectrofotômetro em comprimentos de onda de 480, 649 e 665 nm. Os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais foram determinados seguindo as equações propostas por Wellburn (1994) e expressos por $\mu\text{g cm}^{-2}$.

2.2.6 Resistência da epiderme à perfuração, firmeza de polpa, cor e sólidos solúveis totais

Tomates inteiros (60 dias após a antese) foram avaliados quanto à cor da epiderme do pericarpo, registrada pela escala de Hunter (CIELAB) segundo Lana *et al.* (2006), tomando-se os valores de a^* (alteração da cor verde para vermelha), obtidos diretamente de um colorímetro portátil digital (Minolta CR10 Co, Ltda, Japan).

Os sólidos solúveis foram avaliados utilizando aproximadamente 300 g de pericarpo e homogeneizados por cerca de 2 minutos em processador de alimentos. O extrato filtrado foi analisado em refratômetro manual (modelo 137530 LO).

A resistência à perfuração da epiderme foi determinada utilizando-se sonda de 2 mm de diâmetro, até rompimento da epiderme, enquanto a firmeza de polpa foi determinada utilizando-se sonda de 5 mm de diâmetro, com distância de penetração fixada em 5 mm, após remoção da epiderme no local da análise. Ambos os testes foram feitos na região equatorial dos frutos inteiros maduros (60 dias após a antese) com

velocidade de penetração de 1 mm s^{-1} , utilizando-se máquina universal de testes mecânicos (Instron, série 3367 EUA, 2005). Os resultados foram expressos em Newton (N).

Todos os testes foram analisados em cinco repetições por tratamento, cada repetição sendo constituída por amostras de três frutos distintos e de idade/morfologia semelhante.

2.2.8 Análises físicas de frutos e quantificação de ácido fítico em sementes de plantas-controle e linhagens transgênicas silenciadas para *MIPSI*

Frutos de 60 dias após a antese foram avaliados quanto ao peso em gramas do fruto inteiro, polpa, mucilagem com sementes e número de sementes normais.

Estas variáveis foram avaliadas isoladamente para a determinação das razões: número de sementes normais/massa do fruto inteiro, massa da polpa/massa do fruto inteiro, massa da polpa/número de sementes normais, massa da polpa/massa mucilagem e sementes. Foram analisadas cinco repetições por tratamento contendo três frutos cada repetição.

O ácido fítico foi quantificado conforme Haug e Lantzsc (1983). Para tanto 0,015g de sementes normais, secas e pulverizadas de plantas-controle e plantas transformadas foram tratadas com 1,5 ml de HCl 0,2 M, agitadas durante 30 min a 25 °C e centrifugadas a 14.000 rpm por 15 min. Ao sobrenadante (0,5 mL) foi adicionado 1 mL de solução de FeCl_3 0,11g L^{-1} em HCl 0,2M, aquecido por 30 min a 100 °C, resfriado à temperatura ambiente e centrifugado a 4.000 rpm durante 15 min a 25 °C. Ao sobrenadante (0,5 mL) foi acrescentado 0,75 mL de solução de biperidina (10 g de biperidina, 10 mL de ácido tioglicólico em 1000 mL de água destilada). O produto foi quantificado espectrofotometricamente em $A_{519\text{nm}}$ e os valores obtidos foram transformados em concentração de ácido fítico pelo uso de uma curva padrão de fitato de sódio. A concentração de ácido fítico foi expressa em mg g^{-1} de massa seca de sementes. Foram analisadas cinco repetições por tratamento contendo três análises bioquímicas por repetição, as análises bioquímicas foram extraídas de um homogeneizado de sementes secas e pulverizadas de vários frutos da mesma planta.

2.2.10 Identificação e quantificação de oligossacarídeos em sementes e folhas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

Os açúcares sacarose, estaquiose, rafinose, xilose, glicose, inositol e frutose foram quantificados em sementes de plantas-controle e plantas transgênicas. Foram analisadas cinco repetições por tratamento contendo uma análise bioquímicas por repetição, as análises bioquímicas foram extraídas de um homogeneizado de sementes secas pulverizadas de vários frutos da mesma planta ou folíolos secos da folha do terceiro entrenó.

Inicialmente a extração da fração oleosa de 0,03 g de sementes secas e pulverizadas foi realizada por três extrações sucessivas com 1,0 mL de éter de petróleo a 42 °C por 5 min. Em seguida os oligossacarídeos foram extraídos em três etapas sucessivas com etanol 80% a 100 °C por 5 min. O extrato alcoólico total foi evaporado a 50 °C e os oligossacarídeos ressuspensos em 1,0 mL de etanol 80% e reservados a -20 °C. Essa solução foi submetida à centrifugação por 10 min e filtrada em filtro Milipore de 0,45 µm.

O extrato filtrado foi analisado em cromatografia líquida de alto desempenho SHIMADZU, modelo SPD-10A VP, detector de índice de refração RID 6 A, coluna de fase estacionária aminopropil (-NH₂) (30 cm x 4.5 mm), fluxo 1,0 mL min⁻¹ sob pressão 42 kgf, fase móvel de acetonitrila:água (80:20) a 35 °C. Os oligossacarídeos foram identificados em comparação com os tempos de retenção e quantificados por curva de concentração padronizada.

2.2.11 Teste de germinação e desenvolvimento de plântulas.

Para o teste de germinação foram analisadas três repetições por tratamento, contendo 10 sementes normais cada. As sementes foram semeadas em caixas tipo gerbox contendo papel filtro, tipo Germitest[®], umedecido com água na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. As sementes foram incubadas em germinadores a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas.

O resultado consistiu na percentagem de plântulas normais obtidas no décimo quarto dia após a semeadura para a germinação total, como descrito nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

Para o teste de desenvolvimento de plântulas, três repetições de 10 sementes cada, foram semeadas sobre uma linha de referência, de forma linear e equidistante em caixas tipo gerbox contendo papel filtro, tipo Germitest[®], umedecido com água na

proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. As caixas foram colocadas em germinador a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas na posição vertical. No décimo quarto dia após a semeadura foram efetuadas as medições do comprimento de hipocótilo e raiz primária das plântulas normais com o auxílio de régua graduada em centímetros. Os resultados foram expressos em centímetros por plântulas normais (Nakagawa, 1999)

2.2.12 Delineamento experimental e análise dos dados.

As plântulas transgênicas com cinco diferentes níveis de expressão para *MIPSI* e plantas-controle foram multiplicadas por enraizamento adventício utilizando ramos basais laterais a fim de obter cinco replicatas por nível de expressão. O enraizamento foi conduzido em sistema hidropônico contendo solução nutritiva de Hoagland com metade da concentração dos nutrientes (Hoagland e Arnon, 1950).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em cultivo hidropônico em caixas de isopor de 5 litros contendo solução nutritiva Hoagland meia força, renovada semanalmente até a frutificação, dispostos em delineamento inteiramente casualizado. Os dados das variáveis analisadas foram submetidos ao Teste *t* Student ($p > 0.05$).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Análise de PCR e expressão de *MIPSI* por RT-qPCR em plantas T₁.

A análise de PCR, utilizando iniciadores para o gene de resistência à higromicina, comprovou a integração da sequência transgênica ($\Delta GmMIPSI$) no DNA extraído de folhas de nove plantas da progênie T₁ da linhagem MT 2 de tomateiro 'Moneymaker'.

O nível de expressão de *MIPSI* foi avaliado por RT-qPCR, encontrando expressão diferencial de *MIPSI* nos transgenes T₁ avaliados (Figura 3). O gene normalizador adenina fosforibosiltransferase (APT1) se apresentou mais eficiente quando comparado aos genes actina, β -6-tubulina e fator de alongamento 1 α como controle interno, sendo utilizado como referência em todas as análises de RT-qPCR.

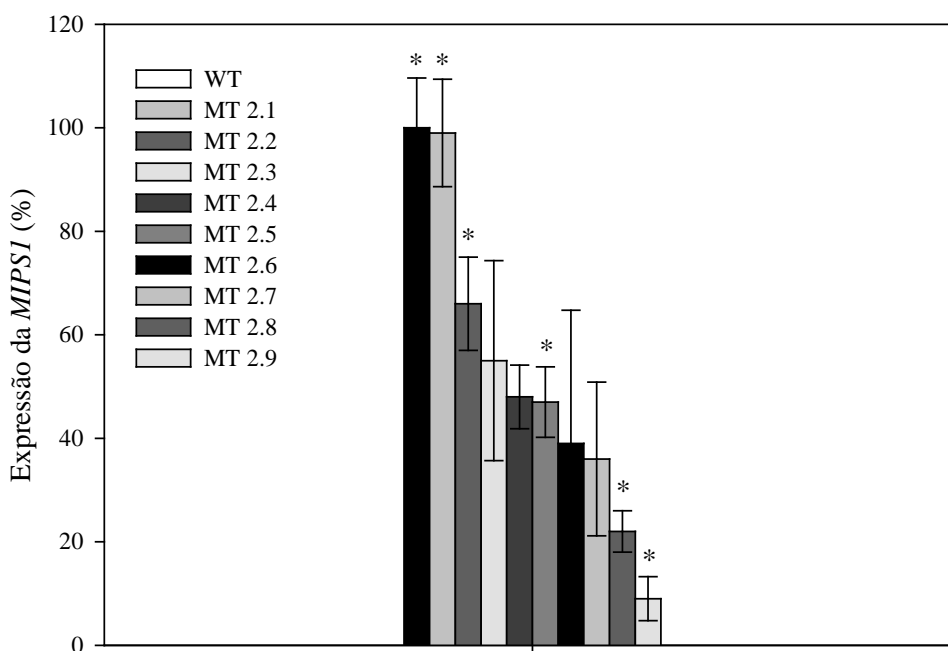


Figura 3. Expressão do gene *MIPSI* em folhas de plantas transgênicas da progênie T₁ da linhagem MT 2 'Moneymaker'. Asterisco indica as linhagens selecionadas nesse estudo. Barras indicam o erro padrão (n = 3).

Com base nos níveis de expressão de *MIPSI* na progênie T₁ transgênica 5 linhas com diferentes níveis de expressão e baixo erro padrão foram selecionadas (WT, MT 2.1; MT 2.2; MT 2.5; MT 2.8 e MT 2.9). As plantas MT 2.3; MT 2.4; MT 2.6 e MT 2.7 foram desconsideradas devido a interposição das medias de expressão com elevado erro padrão da média de expressão da *MIPSI*.

2.3.3 Quantificação de pigmentos fotossintéticos

Os conteúdos de pigmentos fotossintéticos em folhas de plantas silenciadas não apresentaram diferença nos níveis de silenciamento (Figura 4).

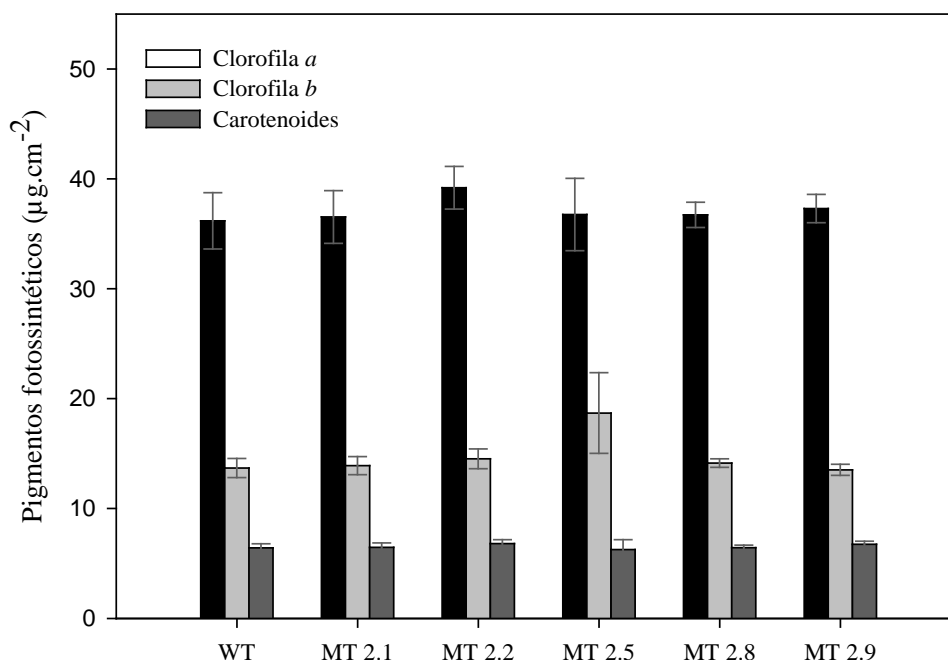


Figura 4. Quantificação de pigmentos fotossintéticos em folhas de plantas-controle (WT) e progênie T₁ silenciada de tomates ‘MoneyMaker’. Barras indicam o erro padrão (n = 5).

2.3.4 Resistência da epiderme à perfuração, firmeza de polpa, cor, sólidos solúveis totais, análises físicas de frutos e quantificação de ácido.

A resistência da epiderme à perfuração e a firmeza de polpa à compressão apresentaram redução significativa em frutos inteiros das linhagens silenciadas quando comparado com plantas-controle (Figura 5 A-B).

O fator *a** referente à mudança da coloração verde para a vermelha não apresentou diferença significativa.

Os sólidos solúveis totais de frutos de plantas silenciadas apresentaram diferenças significativas e a linhagem MT 2.9 foi superior aos demais demonstrando que a variável sólidos totais é alterada pelo silenciamento no pericarpo de frutos (Figura 5 C).

A massa do fruto reduziu significativamente nas linhagens MT 2.1 e MT 2.9 (Figura 5 D). A razão entre as massas da polpa/fruto não diferiu significativamente (Figura 5 E), enquanto a razão das massas polpa/sementes das linhas silenciadas MT 2.5

e MT 2.9 apresentou superiores às plantas-controle, provavelmente devido a redução acentuada de desenvolvimento de sementes normais (Figura 5 F); porém a razão polpa/sementes normais (unidades) variou entre o níveis de silenciamento apresentando redução na linhagem MT 2.1 (Figura 5 G). A razão entre sementes normais (unidades)/fruto (g) apresenta a redução e assim, padrão alterado no desenvolvimento de sementes nas linhagens MT 2.5 e MT 2.9 (Figura 5 H).

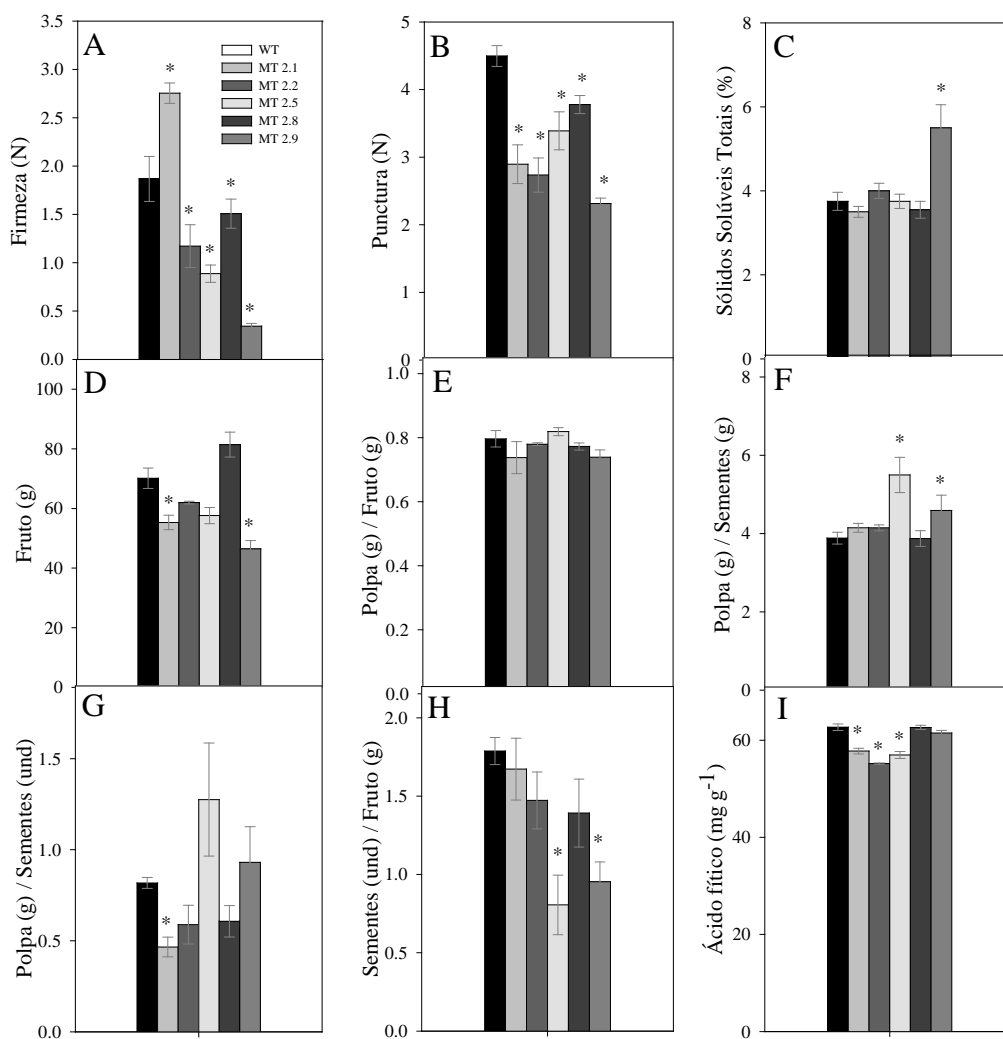


Figura 5. Análise de resistência da epiderme e da polpa, sólidos solúveis totais, análise física dos frutos e quantificação de ácido fítico de sementes de frutos de plantas-controle (WT) e linhas da progênie T₁ silenciadas de tomateiros 'Moneymaker'. **A-** firmeza do pericarpo; **B-** punctura da epiderme; **C-** sólidos solúveis totais; **D-** fruto (g); **E-** razão entre polpa (g)/fruto (g); **F-** razão entre polpa (g)/sementes (g); **G-** razão entre polpa (g)/sementes normais (unidades); **H** razão entre sementes normais (unidades)/fruto (g) e **I-** Quantificação de ácido fítico em sementes. Asterisco indica diferença significativa pelo teste-*t* ($p > 0.05$) em comparação com a planta-controle. Barras indicam erro padrão (n = 5).

A redução do ácido fítico foi significativa nas linhagens MT 2.1, 2.2 e 2.5 (Figura 5 I). Os frutos da linhagem MT 2.5 apresentaram menor quantidade de sementes com o endosperma bem desenvolvido e mesmo essas apresentaram redução significativa

do conteúdo de ácido fítico. Sementes normais das linhagens MT 2.8 e 2.9 retomaram a capacidade de estocar ácido fítico, com uma redução menos expressiva do conteúdo de fitatos (Figura 5 I).

2.3.5 Quantificação de açúcares em folhas e sementes

Em extrato foliar, os conteúdos de xilose, sacarose, inositol e frutose apresentaram diferença significativa. Estaquiase, rafinose e glicose não foram identificadas em folhas (Figura 6 A).

A concentração foliar de sacarose foi diferente, mostrando redução nas linhagens MT 2.1, MT 2.5, MT 2.8 e MT 2.9. O inositol apresentou redução nas plantas dos diferentes níveis de expressão, sendo esta redução crescente quanto ao nível de silenciamento e apresentando redução significativa em MT 2.1 e MT 2.8. A xilose apresentou acúmulo significativo nas linhagens MT 2.2, MT 2.5 e MT 2.8. A frutose apresentou redução nas linhagens silenciadas, sendo esta redução significativa em todas as linhagens (Figura 6 A).

Nos extratos de sementes, os conteúdos de rafinose xilose e glicose foram diferentes estatisticamente, apresentando acúmulo quando comparados com as plantas-controle através do teste-*t* ($p > 0,05$), o conteúdo de sacarose não diferiu entre as linhagens. Os açúcares estaquiase, inositol e frutose não foram detectados em sementes (Figura 6 B).

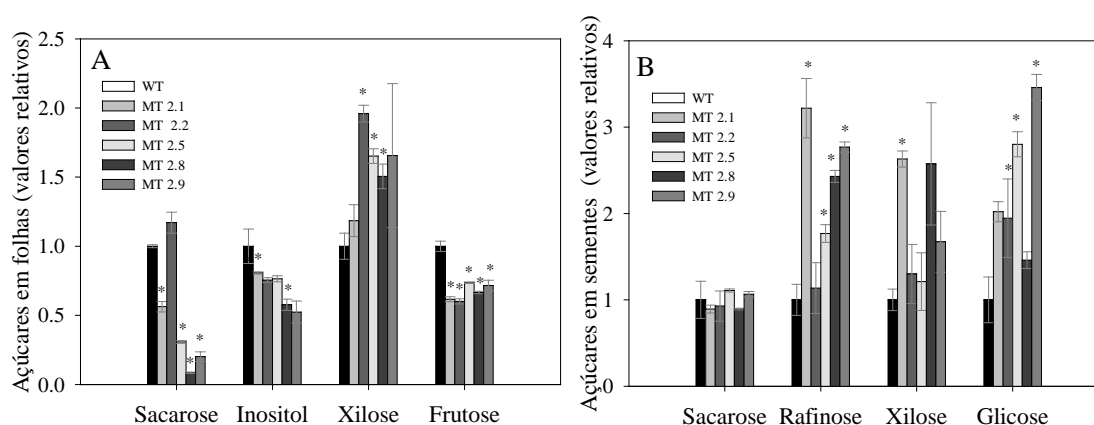


Figura 6. Açúcares em sementes e folhas de plantas-controle (WT) e progênie transgênica T₁ silenciada de tomateiros ‘Moneymaker’. Asterisco indica diferença significativa pelo teste-*t* ($p > 0,05$) em comparação com a planta-controle. Barras indicam erro padrão ($n = 5$).

2.3.6 Teste de germinação e desenvolvimento de plântulas.

A germinação foi altamente prejudicada em sementes provenientes de plantas das linhagens silenciadas. As plantas-controle apresentaram germinação acima de 90% enquanto as linhagens silenciadas apresentaram germinação decrescente correspondendo ao nível de silenciamento da *MIPS*, atingindo apenas 32% de germinação das sementes de plantas da linhagem MT 2.9 (Figura 7 A).

Dentre as sementes de plantas silenciadas que germinaram, as capazes de produzir plântulas normais, correspondem a um percentual ainda menor. Plântulas normais são consideradas as sementes germinadas com emissão de radícula e epicótilo completos que sob condições favoráveis, tem a capacidade de crescer e se transformar em planta normal (Brasil, 2009). Esse percentual diferiu pouco em plantas-controle, porém nas linhagens transgênicas houve drástica redução, nessas, as sementes germinaram emitindo a raiz primária, mas as plântulas não apresentaram padrão normal de desenvolvimento ou permaneceram apenas com a emissão da raiz primária (Figura 7 B).

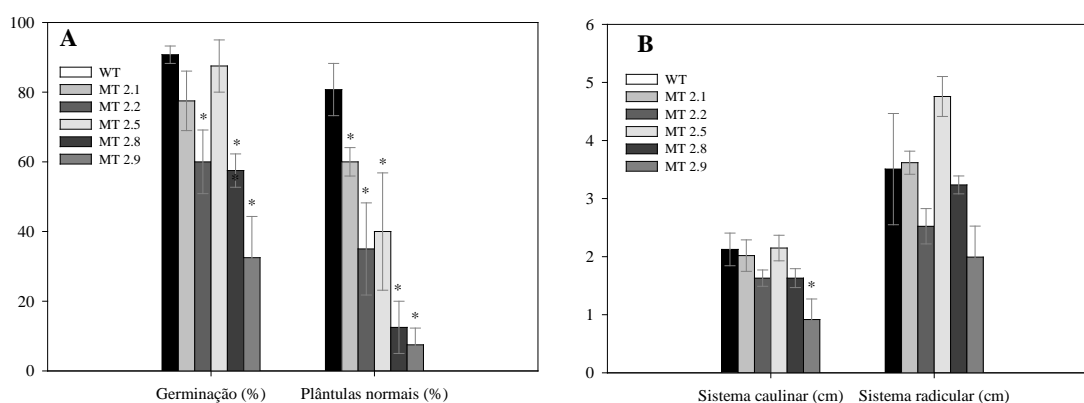


Figura 7. Teste de germinação e desenvolvimento de plântulas em sementes de plantas-controle (WT) e progênie transgênica T₁ silenciadas de tomateiros 'Moneymaker'. Asterisco indica diferença significativa pelo teste-t (p > 0.05) em comparação com plantas-controle. Barras indicam erro padrão (n = 3).

As sementes germinadas com formação de plântulas normais foram avaliadas quanto ao crescimento do sistema caulinar e do sistema radicular. Os resultados apontaram diferença no desenvolvimento do sistema caulinar em plântulas da linhagem MT 2.9. O desenvolvimento da raiz primária não foi afetado em plântulas normais.

2.4 DISCUSSÃO

Os diferentes níveis de silenciamento nas progênies transgênicas alteram o conteúdo de açúcares, oligossacarídeos, desenvolvimento morfogênico de frutos e plântulas além de outras substâncias e que direta ou indiretamente demandam o *mio*-inositol e adequados níveis de expressão da *MIPS*. A biossíntese de *mio*-inositol é um processo altamente regulado, envolvido em diferentes e importantes vias bioquímicas do metabolismo vegetal (Seelan *et al.*, 2009; Torabinejad *et al.*, 2009).

Estudos anteriores relatam que elevados níveis de silenciamento podem induzir respostas não vantajosas (Keller *et al.*, 1998; Nunes *et al.*, 2006). Nesse sentido foram avaliadas plantas-controle e silenciadas entre 99% até 9% de expressão de *MIPS*, demonstrando o comportamento das respostas fisiológicas aos níveis de silenciamento.

Nessas plantas, o silenciamento não alterou o conteúdo de pigmentos fotossintéticos em folhas, pH e cor dos frutos avaliados. A concentração de sólidos solúveis totais (SST) foi maior apenas na linhagem com a menor expressão da *MIPS* (Figura 6). Isso pode ter ocorrido devido à redução da conversão de glicose-6-P para *mio*-inositol, resultando em acúmulo de açúcares. Em relação ao valor apresentado em °Brix, frutos de tomate apresentam teores entre 3,0 a 6,0 °Brix, desse teor, cerca da metade é composta de açúcares e 1/8 de ácidos orgânicos, sendo que os açúcares predominantes são glicose e frutose e o ácido predominante é o cítrico (Jones Júnior, 1999).

A percentagem de sólidos solúveis (SST) totais influencia significativamente o rendimento industrial, principalmente o peso final do produto processado. Em alguns países, a percentagem de sólidos solúveis é utilizada como base na determinação do preço do tomate destinado ao processamento industrial (Colla *et al.*, 2001). O teor de açúcares totais e açúcares redutores afetam o atributo gosto, doçura, acidez e flavor, que por sua vez, pode estar relacionado ao grau de amadurecimento e ao teor de SST (Zambrano *et al.*, 1996; Gil *et al.*, 2002; Miguel *et al.*, 2007). Esta característica não é afetada pelo modo de cultivo, quando avaliado plantios convencionais e orgânicos (Afssa, 2003; Ferreira *et al.*, 2010) ou com diferentes doses de nitrogênio (Pandey *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2000; Warner *et al.*, 2004). Desta forma, o silenciamento da *MIPS* pode apresentar benefícios por incrementar o teor de °Brix em frutos quando em nível de silenciamento que proporcione esta resposta.

As resistências da epiderme e do pericarpo apresentaram redução relacionada aos níveis de expressão da *MIPS*. A resistência física pode ser influenciada pela expressão da *MIPS* devido à estruturação das membranas e paredes celulares, uma vez que o *mio*-inositol é constituinte das moléculas de hemicelulose, pectina e xilose (Sharples e Fry 2007).

A firmeza está fortemente correlacionada com o conteúdo de pectina presente nos frutos e à medida que os frutos amadurecem ocorre degradação das substâncias pecticas, levando ao amolecimento da polpa (Rocca, 2009). A pectina é constituída de aproximadamente um terço da estrutura das paredes celulares (Hwang *et al.*, 1993; Ridley *et al.*, 2001), em que participa da adesão célula a célula através da ligação cruzada de cálcio entre os homogalacturonanos na lamela média (Jarvis *et al.*, 2003; Vincken *et al.*, 2003). Celulose combinado com a pectina e hemicelulose constituem a parede celular primária que mantém a firmeza dos frutos (Pirrello *et al.*, 2009).

O processo de alteração da textura da fruta é muito complexo e muitas famílias de proteínas, com atividade enzimática, juntamente com as relações de água e os radicais livres contribuem para isso. Nesse processo incluem a atividade da poligalacturonase (PG), metilesterases de pectina (PMEs), β -galactosidase, β -mananase, xiloglucano xiloglucosil-transferase/endohidrolase (XET), liase de pectato (PL), endo- β -1,4-glucanases (EGases, celulases), expansinas, α -manose e β -Hexoses (Seymour *et al.*, 2013). Essas enzimas apresentam atividade aumentada durante o processo de maturação no metabolismo de parede celular.

A perda de firmeza em tomates está relacionada não apenas à perda de turgor, causada pela perda de água, mas, principalmente, ao metabolismo da parede celular, ocorrendo extensiva despolimerização da pectina e hemicelulose acompanhada de fraca despolimerização da celulose. Consequentemente, há redução das forças coesivas que mantém as células unidas, resultantes da ação das cujas atividades são aceleradas no início do amadurecimento e na senescência (Brummell, 2001; Brackmann, 2007).

As análises físicas dos frutos apresentaram redução de massa de frutos nas plantas silenciadas, tendo as plantas-controle frutos maiores e mais desenvolvidos. Porém, a razão entre massa de polpa por massa de sementes e mucilagem demonstrou uma maior produção de polpa nas linhagens MT 2.5 e MT 2.9 devido ao reduzido número de sementes; de maneira similar a relação entre polpa por unidades de sementes normais apresenta decréscimos nos níveis em que o número de sementes normais é maior. Porém, quando analisado a porção da polpa em relação ao fruto inteiro, não

observamos diferença, podendo afirmar que o padrão alterado no fruto é a produção de sementes.

As características fenotípicas do fruto são controladas por múltiplos genes. Locos de características quantitativas (QTL) e marcadores moleculares localizaram regiões genômicas e genes responsáveis por vários atributos fenotípicos de fruto, como o tamanho do fruto, o peso e a forma, em várias espécies, incluindo o tomate (van der Knaap *et al.*, 2002; Tanksley, 2004). Cerca de 30 QTL afetam o tamanho e rendimento dos frutos do tomateiro. Os QTL de loci ortólogos que regulam a forma do fruto do tomate, massa e tamanho também estão presentes em pimentão (*Capsicum annuum*) e berinjela (*Solanum melongena*) (Tanksley, 2004; Frary *et al.*, 2004).

O gene Fw2.2 é responsável por aproximadamente 30% da variação das características fenotípicas, ele codifica uma proteína de expressão específica em fruto, que regula negativamente a mitose e possivelmente parte do sinal de transdução do ciclo celular (Cong e Tanksley, 2006). O número de células do pericarpo em tomate também está relacionado com a expressão do gene MADS-box TOMATE AGAMOUS (TAG)-Like1 (*TAGL1*) (Vrebalov *et al.*, 2009). *TAGL1* é expresso em órgãos florais e frutos jovens de tomate, bem como durante o amadurecimento, é um dos mais abundantes MADS-box genes expressos em tecidos jovens de frutos (Matas *et al.*, 2011). O silenciamento de *TAGL1* em frutos de tomate resulta na redução na espessura do pericarpo de 25 para 15 camadas em frutos de 28 e 38 dias respectivamente após a antese e o endocarpo é ausente.

Outro gene relacionado ao tamanho do fruto é a quinase do ciclo celular *WEE1*. Em tomate produz fenótipo de fruto pequeno quando suprimido e pode atuar como um regulador de endoreduplicação, um processo chave envolvido no crescimento dos frutos e determinante do peso do fruto (Cheniclet *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2007).

A produção de sementes, avaliada pela razão entre sementes normais/fruto, nos permite avaliar se a proporção de sementes por fruto foi alterada, uma vez que esta avaliação correlaciona o número de sementes com o peso total do fruto do qual as sementes foram coletadas. Nesse sentido, afirmamos que o silenciamento foi capaz de alterar a produção de sementes normais, devido ao decréscimo significativo nessa razão em plantas silenciadas. Os níveis crescentes de silenciamento apresentaram os menores valores dessa razão.

Estudos anteriores relacionaram a expressão de *MIPS* com o aborto em sementes (Nunes *et al.*, 2006) ou estrutura anormal do embrião (Kuwano *et al.*, 2009). As

sementes estão imersas no tecido placentário que preenche as cavidades loculares do fruto e para tomate industrial é importante que as cavidades loculares sejam o mais reduzidas possíveis (Rocca, 2009).

A atividade da MIPS em sementes está presente em todos os estágios de desenvolvimento com o máximo de expressão ao 9º dia após a polinização (Abreu e Aragão, 2007; Chun *et al.*, 2003). Hegeman *et al.* (2001) afirmam que nas sementes de soja a expressão do gene *MIPS* ocorre nos primeiros estágios de desenvolvimento, com sementes de até 10 mm de comprimento. Assim como Nunes *et al.* (2006) relatam aborto anormal de sementes que não herdaram a sequência transgênica indutora de silenciamento da *MIPS*, sugere-se que a expressão de *MIPS* possa estar envolvida com a viabilidade dos embriões e preenchimento de sementes.

Houve diminuição no conteúdo de ácido fítico em algumas linhagens transgênicas, sendo os mais expressivos em 0.66 e 0.47 de expressão do gene *MIPS*, retornando a concentrações similares à plantas-controle em expressões menores (Figura 9) possivelmente por essas sementes não herdarem o transgene indutor de silenciamento. Estudos anteriores relatam a redução de ácido fítico em sementes silenciadas, porém sem a quantificação do silenciamento, em soja com promotor *CaMV 35S* (Nunes *et al.*, 2006) em tomate com promotor *CaMV 35S* (Fernandes, 2009). Em arroz com promotor Oleosin 18 (*Ole 18*) de expressão específica em sementes; a expressão de 0.47 'fold' apresentou diminuição de ácido fítico de 10.28 mg g⁻¹ para 4.27 mg g⁻¹, indicando redução de 58.4% em plantas *MIPS* silenciadas.

A quantificação de açúcares em folhas mostrou redução do conteúdo de inositol crescente de acordo com o silenciamento gênico, onde o conteúdo foi mais reduzido quanto maior o silenciamento. A sacarose e frutose também foram reduzidas nos níveis de silenciamento comparativamente à planta não transformada, porém com variações entre os níveis. Esse comportamento poderia ser explicado pelo forte dreno determinado pelos frutos atuando as folhas como fontes desses açúcares, muito demandados na produção e acúmulo de reservas em frutos.

Em sementes o acúmulo de glicose foi relativo aos níveis de silenciamento, esse padrão demonstra a ligação direta do acúmulo do substrato da atividade da enzima silenciada; a sacarose por sua vez não mostrou diferença.

A xilose variou entre os níveis silenciados em sementes, porém o comportamento da variação não foi relacionado aos níveis de silenciamento, observou-se padrão de resposta tendendo para o acúmulo em plantas silenciadas, mesmo que o

desvio não tenha permitido observar diferença estatística. O conteúdo de xilose não foi reduzido, porém verificou-se acréscimo desse oligossacarídeo em plantas transgênicas, podendo ser em resposta ao acúmulo de glicose e sacarose, uma vez que a síntese de xilose possui duas vias, quer via UDP-glicose ou *mio*-inositol.

A biossíntese de xilose ocorre pela oxidação do *mio*-inositol livre pela *Mio*-inositol oxigenase (*MIOX*) em ácido D-glucurônico (GlcA), que sequencialmente conduzem à formação de ácido UDP-glucurônico (UDP-GlcA) é o nucleotídeo de açúcar necessário para a síntese da parede celular durante o crescimento e desenvolvimento (Sharples e Fry 2007). A via de catabolismo de inositol a ácido glucurônico é termodinamicamente irreversível (Endres e Tenhaken 2009). Em adição à via *MIOX*, UDP-GlcA pode também ser produzido a partir de UDP-glicose por desidrogenase da UDP-glicose (UGD) (Klinghammer e Tenhaken, 2007).

A rafinose mostrou incremento em relação aos níveis de silenciamento, podendo ser decorrente de resposta ao estresse provocado pelo silenciamento na planta e como metabólito de reserva (Nishizawa *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011). O *mio*-inositol-1-P é o substrato para síntese dos oligossacarídeos de rafinose. A primeira reação é catalisada pela sintase do galactinol (GOLS; EC 2.4.1.123) na transferência do resíduo de galactose da UDP-galactose para o inositol, formando o galactinol (Peterbauer e Richter, 2001; Liu *et al.*, 1993), que por sua vez é controlado em nível de substrato (*mio*-inositol) e fatores de resposta ao estresse (Karner *et al.*, 2004). O primeiro oligossacarídeo formado é a rafinose, através da rafinose sintase (EC 2.4.1.82); outros oligossacarídeos (estaquiose, verbascose, ajucose) são formados sequencialmente incorporando unidades de galactosil.

A via OR está intimamente ligada ao metabolismo primário da planta através de *mio*-inositol, sacarose e UDP-galactose. Os oligossacarídeos de rafinose são sintetizados e armazenados em sementes para a aquisição de tolerância à dessecação e para proteção do embrião (Li *et al.*, 2011). Também atuam como molécula de sinalização ao ataque de patógenos ou ferimentos (Cho *et al.*, 2010; Hatitatos *et al.*, 2000). Os OR atuam em resposta a estresses abióticos, como frio, salinidade, déficit hídrico e espécies reativas de oxigênio (Nishizawa *et al.*, 2008).

Galactinol e OR são compostos específicos de plantas, sem representantes em outros reinos. A evolução especializada de galactinol sintase entre as plantas, sem haver registros anteriores, indica importante papel deste grupo de compostos em plantas (Sengupta *et al.*, 2012).

A germinação foi afetada na maioria dos níveis de silenciamento. O desenvolvimento de plântulas normais seguiu padrão semelhante, provavelmente devido a redução da tolerância ao estresse e do enchimento da semente, causados pela redução dos níveis da expressão da *MIPS* que comprometeram a viabilidade do embrião, com comprometimento da germinação e da emergência (Nunes *et al.*, 2006; Fernandes, 2009). A redução dos conteúdos e expressão da *MIPS* também podem influenciar a via alternativa de produção de ascorbato. Ali *et al.* (2013) encontraram redução de 17% do conteúdo de ascorbato em sementes de arroz silenciadas para *MIPS*. O ascorbato é um poderoso antioxidante e desempenha papel importante durante a germinação de sementes (Alimohammadi *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2012).

2.5 CONCLUSÕES

Observou-se aqui que MIPS e seu produto *mio*-inositol atuam em uma gama de processos, desde as respostas morfológicas complexas, como a resistência da epiderme e do pericarpo, °Brix em pericarpo, desenvolvimento de sementes, germinação total e desenvolvimento de plântulas de tomateiro, até conteúdos de compostos isolados, como: ácido fítico, glicose e rafinose em sementes, assim como conteúdos de sacarose, frutose e inositol em folhas.

A alteração na expressão da *MIPS*, gene responsável pela enzima-chave de produção de *mio*-inositol, o qual é necessário em inúmeras vias metabólicas, ocasionou várias alterações em plantas silenciadas. Saliente-se aqui que essas modificações podem ser de interesse industrial e biotecnológico, por resultar na redução de gastos em processos industriais, como o processamento de frutos com redução de sementes e maior concentração de °Brix, e ainda, redução no conteúdo de fitato em sementes.

Assim, a utilização do silenciamento parcial da *mio*-inositol-fosfato sintase pode auxiliar o melhoramento vegetal mediante a alteração de importante compostos envolvidos no metabolismo de *mio*-inositol, além de identificar as diversas vias metabólicas e respostas morfogênicas associados ao *mio*-inositol.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abid G, Silue S, Muhovski Y, Jacquemin JM, Toussaint A, Baudoin JP. 2009. Role of myo-inositol phosphate synthase and sucrose synthase genes in plant seed development. *Gene* 439:1–10

Abreu EFM, Aragão FJL. 2007. Isolation and characterization of a myo-inositol-1-phosphate synthase gene from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressed during seed development and environmental stress. *Annals of Botany* 99:285–292.

AFSSA. 2003. Agence Française De Sécurité Sanitaire Des Aliments - AFSSA. Evaluation nutritionnelle et sanitaire des aliments issus de l'agriculture biologique. République Française.

Ahrens MJ, Huber DJ. 1990. Physiology and firmness determination of ripening tomato fruit. *Physiologia Plantarum* 78:8–14.

Alfenas-Zerbini P, Maia IG, Fávaro RD, Cascardo JCM, Brommonschenkel SH, Zerbini FM. 2009. Genome-wide analysis of differentially expressed genes during the early stages of tomato infection by a Potyvirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 352–361.

Ali N, Paul S, Gayen D, Sarker SN, Datta SK, Datta K. 2013. RNAi mediated down regulation of myo-inositol-3-phosphate synthase to generate low phytate rice. *Rice* 6-12.

Alimohammadi M, Silva K, Ballu C, Ali N, Khodakovskaya MV. 2012. Reduction of inositol (1,4,5)-trisphosphate affects the overall phosphoinositol pathway and leads to modifications in light signaling and secondary metabolism in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* 63:825–835

Amiard V, Morvan-Bertrand A, Billard JP, Huault C, Keller F, Prud'homme MP. 2003. Fructans, but not the sucrosyl-galactosides, raffinose and loliose, are affected by drought stress in perennial ryegrass. *Plant Physiology* 132:2218–222

Barka EA, Kalantari S, Makhlof J, Arul J. 2000. Impact of UV-C irradiation on the cell wall-degrading enzymes during ripening of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:667–671.

Bilyeu KD, Zeng P, Coello P, Zhang ZJ, Krishnan HB, Bailey A, Beuselinck PR, Polacco JC. 2008. Quantitative conversion of phytate to inorganic phosphorus in soybean seeds expressing a bacterial phytase. *Plant Physiology* 146:468–477.

Brackmann A, Steffens CA, Andriolo JL, Pinto JAV. 2007. Armazenamento de tomate cultivar “Cronus” em função do estágio de maturação e da temperatura. *Ciência Rural* 37:1295-1300.

Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : Mapa/ACS, 399 p

Brearley CA, Hanke DE. 1996. Metabolic evidence for the order of addition of individual phosphate esters to the myo-inositol moiety of inositol hexakisphosphate in the duckweed *Spirodela polyrriza* L. *Biochemistry Journal* 314:227-233.

Bregitzer P, Raboy V. 2006. Effects of four independent Low-phytate mutations in barley (*Hordeum vulgare* L.) on seed phosphorus characteristics and malting quality. *Cereal Chemistry* 83:460–464.

Brinch-Pedersen H, Sørensen LD, Holm PB. 2002. Engineering crop plants: getting a handle on phosphate. *Trends in Plant Science* 7:118-125.

Brummell DA .2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology* 33:103–119

Brummell DA, Harpster MH, Civello PM, Palys JM, Bennett AB. 1999. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *The Plant Cell* 11:2203-2216.

Brummell DA, Harpster MH. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 47: 311–340.

Bu J, Yu Y, Aisikaer G, Ying T. 2013. Postharvest UV-C irradiation inhibits the production of ethylene and the activity of cell wall-degrading enzymes during softening of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 86: 337–345.

Campion B, Sparvoli F, Doria E, Tagliabue G, Galasso I, Fileppi M, Bollini R, Nielsen E. 2009. Isolation and characterisation of an lpa (low phytic acid) mutant in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 18:1211–1221.

Carpita NCC, McCann MC. 2008. Maize and sorghum: genetic resources for bioenergy grasses. *Trends in Plant Science* 13:415–420.

Carroll A, Somerville C. 2009. Cellulosic biofuels. *Annual Review of Plant Biology* 60: 165–182.

Cheniclet C, Rong WY, Causse M, Frangne N, Bolling L, Carde J-P, Renaudin J-P. 2005. Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiology* 139:1984-1994.

Chiera JM, Finer JJ, Grabau EA. 2004. Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of *Glycine max* to improve phosphorus availability. *Plant Molecular Biology* 56:895–904

Cho SM, Kang EY, Kim MS, Yoo SJ, Im YJ, Kim YC, Yang KY, Kim KY, Kim KS, Choi YS, Cho BH. 2010. Jasmonate-dependent expression of a galactinol synthase gene

is involved in priming of systemic fungal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Botany* 88: 452–461.

Chun JA, Jin UH, Lee JW, Yi YB, Hyung NI, Kang MH, Pyee JH, Suh MC, Kang C W, Seo HY, Lee SW, Chung CH. 2003. Isolation and characterization of a myo-inositol 1-phosphate synthase cDNA from developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds: functional and differential expression, and salt-induced transcription during germination. *Planta* 216:874–880.

Colla G, Mitchell JP, Poudel DD, Saccardo F, Hartz TK. 2001. Impacts of farming systems and soil characteristics on processing tomato fruit quality. *Acta Horticulturae* 542:333–341.

Cong B, Tanksley SD. 2006. FW2.2 and cell cycle control in developing tomato fruit: a possible example of gene co-option in the evolution of a novel organ. *Plant Molecular Biology*. 62:867–80

Dastidar K, Maitra S, Goswami L, Roy D, Das KP, Majumder AL. 2006. An Insight into the molecular basis of salt tolerance of l-myo-inositol 1-P synthase (PcINO1) from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice. *Plant Physiology* 140:1279–1296.

Davis AR, Fish WW, Perkins-Veazie P. 2003. A rapid spectrophotometric method for analyzing lycopene content in tomato and tomato products. *Postharvest Biology and Technology* 28:425–430.

Donahue JL, Alford SR, Torabinejad J, Kerwin RE, Nourbakhsh A, Ray WK, Hernick M, Huang XY, Lyons BM, Hein PP. 2010. The *Arabidopsis thaliana* Myo-Inositol 1-Phosphate Synthase1 gene is required for myo-inositol synthesis and suppression of cell death. *Plant Cell* 22:888–903.

Doyle JJ, Doyle JL, Hortorium LHB. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.

Endres S, Tenhaken R. 2009. Myoinositol oxygenase controls the level of myo-inositol in *Arabidopsis*, but does not increase ascorbic acid. *Plant Physiology* 149:1042–1049.

Fernandes D. 2009. Morfogênese *in vitro* em tomateiro e berinjela e silenciamento gênico da sintase do mio-inositol-fosfato por RNAi em tomateiro. Dissertação em Fisiologia Vegetal de Magister Scientiae. Universidade Federal de Viçosa. 89 p.

Ferreira MMM, Ferreira GB, Fontes PCR, Dantas JP. 2003. Produção do tomateiro em função de doses de nitrogênio e da adubação orgânica em duas épocas de cultivo. *Horticultura Brasileira* 21:471–476.

Ferreira SMR, Freitas RJS, Karkle ENL, Quadros DA, Tullio LT, Lima JJ. 2010. Qualidade do tomate de mesa cultivado nos sistemas convencional e orgânico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 30:224–230

Fileppi M, Galasso I, Tagliabue G, Daminati MG, Campion B, Doria E, Sparvoli F. 2010. Characterisation of structural genes involved in phytic acid biosynthesis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding* 25:453–470.

Fowler S, Thomashow MF. 2002. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* 14:1675–1690.

Frary A, Fulton T M, Zamir D, Tanksley S D. 2004. Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* x *L. pennellii* cross and identification of possible orthologs in the Solanaceae. *Theoretical and Applied Genetics* 108:485–496.

Gil MI, Conessa MA, Artés F. 2002. Quality changes in fresh cut tomato as affected by modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology* 25:199-207.

Goetz M, Vivian-Smith A, Johnson SD, Koltunow AM. 2006. AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in Arabidopsis. *Plant Cell* 18:1873-1886

Gonzalez N, Ge´vaudant F, Hernould M, Chevalier C, Mouras A. 2007. The cell cycle-associated protein kinase WEE1 regulates cell size in relation to endoreduplication in developing tomato fruit. *Plant Journal* 51:642-655.

Goyoaga C, Burbano C, Cuadrado C, Romero C, Guillamón E, Varela A, Pedrosa MM, Muzquiz M. 2011. Content and distribution of protein, sugars and inositol phosphates during the germination and seedling growth of two cultivars of *Vicia faba*. *Journal of Food Composition and Analysis* 24:391–397.

Hatitatos A, Ayre GB, Turgeon R. 2000. Identification of phloem involved in assimilate loading in leaves by the activity of the galactinol synthase promoter. *Plant Physiology* 123:929–938.

Haug W, Lantzsch HJ. 1983. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *Journal of Food Science and Agriculture* 34:1423-1426.

Heaton EA, Flavell RB, Mascia PN, Thomas SR, Doehleman FG, Long SP. 2008. Herbaceous energy crop development: recent progress and future prospects. *Current Opinion in Plant Biotechnology* 19:202–209.

Hegeman CE, Good LL, Grabau EA. 2001. Expression of D-myo-inositol-3-phosphate syntase in soybean. Implications for phytic acid biosynthesis. *Plant Physiology* 125:1941-1948.

Hiscox JD, Israelstam GF. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*. 57:1332- 1334.

Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The Water-Cultured Method for Growing without Soil. Circular n° 347. *California Agricultural Experiment Station*. 32 p.

- Horbowicz M, Obendorf RL. 1994. Seed desiccation tolerance and storability: dependence of flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols. Review and survey. *Seed Science Research* 4:385–405.
- Hwang J, Pyun YR, Kokini JL. 1993. Sidechains of pectins: some thoughts on their role in plant cell walls and foods. *Food Hydrocolloids* 7:39–53.
- Jarvis MC, Briggs SPH, Knox JP. 2003. Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell & Environment* 26: 977–989.
- Jones Júnior JB. 1999. *Tomato plant culture: in the field, greenhouse and home garden*. Florida: CRC Press. 199p.
- Karner U, Peterbauer T, Raboy V, Jones DA, Hedley CL, Richter A. 2004. Myo-inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds. *Journal of Experimental Botany* 55:1981–1987.
- Keller R, Brearley CA, Trethewey RN, Muller-Rober B. 1998. Reduced inositol content and altered morphology in transgenic potato plants inhibited for 1D-myo-inositol 3-phosphate synthase. *Plant Journal* 16:403–410
- Kersting MC, Boyette M, Massey J, Ryals PE. 2003. Identification of the inositol isomers present in Tetrahymena. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 50:164–168
- Kim MS, Cho SM, Kang EY, Im YJ, Hwangbo H, Kim YC, Ryu CM, Yang KY, Chung GC, Cho BH. 2008. Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 root colonization. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 21:1643–1653
- Klinghammer M, Tenhaken R. 2007. Genome-wide analysis of the UDP-glucose dehydrogenase gene family in Arabidopsis, a key enzyme for matrix polysaccharides in cell walls. *Journal of Experimental Botany* 58:3609–21.
- Knapp S. 2002. Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *Journal of Experimental Botany* 53:2001–2022.
- Kuwano M, Mimura T, Takaiwa F, Yoshida KT. 2009. Generation of stable ‘low phytic acid’ transgenic rice through antisense repression of the 1D-myo-inositol 3-phosphate synthase gene using the 18-kDa oleosin promoter. *Plant Biotechnology Journal* 7:96–105.
- Lamaire-Chamley M, Petit J, Garcia V, Just D, Baldet P, Germain V, Fagard M, Mouassite M, Cheniclet C, Rothan C. 2005. Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. *Plant Physiology* 139:750–769.
- Lana MM, Tijskens LMM, Kooten OV. 2006. Modelling RGB colour aspects and translucency of fresh-cut tomatoes. *Postharvest Biology and Technology* 40:15–25.

- Larson SR, Rutger JN, Young KA, Raboy V. 2000. Isolation and 617 genetic mapping of a non-lethal rice (*Oryza sativa* L.) low phytic acid 1 mutation. *Crop Science* 40:1397–1405.
- Larson SR, Young KA, Cook A, Blake TK, Raboy V. 1998. Linkage mapping of two mutations that reduce phytic acid content of barley grain. *Theoretical and Applied Genetics* 97:141–146 616.
- Li P, Wind JJ, Shi X, Zhang H, Hanson J, Smeekens SC, Teng S. 2011. Fructose sensitivity is suppressed in Arabidopsis by the transcription factor NAC089 lacking the membrane-bound domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 108: 3436–3444.
- Liu J, Stevens C, Khan V, Lu J, Wilson C, Adeyeye O, Kabwe M, Pusey P, Chalutz E, Sultana T. 1993. Application of ultraviolet-C light on storage rots and ripening of tomatoes. *Journal of Food Protection* 56:868–873.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25:402–408.
- Loewus FA, Jang R, Seegmiller CG. 1958. *J. Biol. Chem.*, 232, 533.
- Loewus FA, Loewus MW. 1983. *myo*-Inositol : its biosynthesis and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* 34:137-161.
- Loewus FA, Murthy PPN. 2000. *Myo*-inositol metabolism in plants. *Plant Science* 150: 1–19.
- Loewus FA, Stanley K, Neufeld EF. 1962. Metabolism of *myo*-Inositol in plants: conversion to pectin, hemicellulose, D-xylose, and Sugar Acids. *Biochemistry*. 48.
- Lopez-Casado G, Urbanowicz BR, Damasceno CMB, Rose JKC. 2008. Plant glycosyl hydrolases and biofuels: a natural marriage. *Current Opinion in Plant Biology* 11:329–337.
- Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL. 2004. *Myo*-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology* 134:1200–1205.
- Lott JNA, Greenwood JS, Batten GD. 1995. Mechanisms and regulation of mineral nutrient storage during seed development. In: Kigel, J. and Galili, G. (eds) *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker, New York 215–235.
- Lott JNA. 2000. Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: a global estimate. *Seed Science Research* 10:11– 33.
- Majumder AL, Biswas BB. 2006. *Biology of Inositols and Phosphoinositides*. Springer, Netherlands (Ed).
- Majumder AL, Johnson MD, Henry SA. 1997. 1L-*myo*Inositol-1-phosphate synthase. *Biochimica Biophysica Acta* 1348:245–25.

- Marga F, Pesacreta TC, Hasenstein KG. 2001. Biochemical analysis of elastic and rigid cuticles of *Cirsium horridulum*. *Planta* 213:841–848
- Matas AJ, Yeats TH, Buda GJ, Zheng Y, Chatterjee S, Tohge T, Ponnala L, Adato A, Aharoni A, Stark R, Fernie AR, Fei Z, Giovannoni JJ, Rose JKC. 2011. Tissue- and cell-type specific transcriptome profiling of expanding tomato fruit provides insights into metabolic and regulatory specialization and cuticle formation. *Plant Cell* 23:3893–910
- Miguel ACA. 2007. Qualidade de tomate “Débora” minimamente processado armazenado em dois tipos de embalagens. *Horticultura Brasileira* 25:582-585.
- Morita N, Nakazato H, Okuyama H, Kim Y, Thompson GA. 1996. Evidence for a glycosylinositolphospholipid-anchored alkaline phosphatase in the aquatic plant *Spirodela oligorrhiza*. *Biochimica Biophysica Acta* 1290:53–62.
- Morré DJ, Boss WF, Loewus FA. 1990. *Inositol Metabolism in Plants*. (Eds.) Wiley-Liss, New York, p 393.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Murphy AM, Otto B, Brearley CA, Carr JP, Hanke DE. 2008. A role for inositol hexakisphosphate in the maintenance of basal resistance to plant pathogens. *Plant Journal* 56:638–652.
- Nakagawa J. 1999. Testes de vigor baseados no desenvolvimento das plântulas. In: Krzyzanowski FC, Vieira RD, França-Neto JB. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES 2:1-24.
- Nakazato H, Okamoto T, Nishikoori M, Washio K, Morita N, Haraguchi K, Thompson Jr GA, Okuyama H. 1998. The glycosylphosphatidylinositol-anchored phosphatase from *Spirodela oligorrhiza* is a purple acid phosphatase. *Plant Physiology* 118:1015–1020.
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S. 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology* 147:1251–1263.
- Nitsch JP. 1969. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology* 19:389-404.
- Normanly J. 2010. Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology* 2:1594
- Nunes A, Vianna G, Cuneo F, Amaya-Farfán J, Capdeville G, Rech E, Aragão F. 2006. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPSI*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta* 224:125-132.

Okada M, Ye K. 2009. Nuclear phosphoinositide signaling regulates messenger RNA export. *RNA Biology* 6:12–16.

Panikulangara TJ, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, Stransky H, Schöff F. 2004. Galactinol synthase 1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in Arabidopsis. *Plant Physiology* 136:3148–3158.

Pauly M, Keegstra K. 2008. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant Journal* 54:559–568.

Peterbauer T, Richter A. 1998. Galactosylononitol and stachyose synthesis in seeds of adzuki bean: purification and characterization of stachyose synthase. *Plant Physiology* 117:165–172

Pirrello J, Regad F, Latché A, Pech J, Bouzayen CM. 2009. Regulation of tomatofruit ripening. *CAB Reviews* 4: 1–14.

Raboy V. 2000. Genetics and breeding of seed phosphorus and phytic acid. *Journal of Plant Physiology* 158:489–497.

Raboy V. 2006. Seed phosphorus and the development of low-phytate crops, in: Turner BL, Richardson AE, Mullaney EJ, (Eds.). *Inositol Phosphates: Linking Agriculture and Environment*, CAB International, Oxfordshire 111–132.

Reynolds CS, Davies PS. 2001. Sources and bioavailability of phosphorus fractions in freshwaters: a British perspective. *Biology Review* 76:27–64.

Ridley BL, O'Neil MA, Mohnen D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57:929–967.

Rocca MGG. 2009. Valorização do tomate nacional extração de licopeno por CO₂ supercrítico a partir de repiso de tomate. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa. p. 68.

Sasaki K, Nagahashi G, Gretz MR, Taylor IEP. 1989. Use of Per-C-deuterated myoinositol for study of cell wall synthesis in germinating beans. *Plant Physiology* 90:686–689.

Sato T, Atomi H. 2011. Novel metabolic pathways in Archaea. Ecology and industrial microbiology / Special section: *Archaea*. 14:307–314

Scherer J. 1850. Ueber eine neue, aus dem Muskelfleische gewonnene Zuckerart, Liebigs. *Analytical Chemistry* 73:322–328.

Seelan RS, Lakshmanan J, Casanova MF, Parthasarathy RN. 2009. Identification of myo-inositol-3-phosphate synthase isoforms: characterization, expression and putative role of a 16-kDa γ c isoform. *Journal of Biological Chemistry* 284:9443–9457

- Sengupta S, Mukherjee S, Parween S, Majumder AL. 2012. Galactinol synthase across evolutionary diverse taxa: Functional preference for higher plants? *FEBS Letters* 586:1488–1496.
- Seymour GB, Ostergaard L, Chapman NH, Knapp S, Martin C. 2013. Fruit development and ripening. *Annual Review of Plant Biology* 64:11.1–11.23.
- Sharples SC, Fry SC. 2007. Radioisotope ratios discriminate between competing pathways of cell wall polysaccharide and RNA biosynthesis in living plant cells. *Plant Journal* 52:252–262.
- Sheveleva E, Chmara W, Bohnert HJ, Jensen RG. 1997. Increased salt and drought tolerance by d-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiology* 115:1211–1219.
- Shi J, Wang H, Hazebroek J, Ertl DS, Harp T. 2005. The maize low-phytic acid three encodes a myo-inositol kinase that plays a role in phytic acid biosynthesis in development seed. *Plant Journal* 42:708–719
- Shi J, Wang H, Wu Y, Hazebroek J, Meeley RB, Ertl DS. 2003. The maize low-phytic acid mutant *lpa2* is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gene. *Plant Physiology* 131:507–515
- Shi J, Wang H, Schellin K, Li B, Faller M, Stoop JM, Meeley RB, Ertl DS, Ranch JP, Glassman K. 2007. Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. *Nature Biotechnology* 25:930–937
- Stahl W, Sies H. 1999. Carotenoids: occurrence, biochemical activities, and bioavailability. In: Packer, L.; Hiramatsu, M.; Yoshikawa, T. (Eds). *Antioxidant food supplements in human health*. San Diego: Academic Press, p.183-202.
- Stevenson JM, Perera IY, Heilmann I, Persson S, Boss WF. 2000. Inositol signaling and plant growth. *Trends in Plant Science* 5:252–258.
- Stevenson-Paulik J, Bastidas RJ, Chiou ST, Frye RA, York JD. 2005. Generation of phytate-free seeds in *Arabidopsis* through disruption of inositol polyphosphate kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A* 102:12612–12617.
- Suarez FL, Springfield J, Furn J K, Lohrmann TT, Kerr PS, Levett MD. 1999. Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from Beans naturally low in oligosaccharides. *American Journal of Clinical Nutrition* 69:135-139.
- Sugimoto-Shirasu K, Roberts K. 2003. ‘Big it up’: endoreduplication and cell-size control in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 6:544-553
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2002. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 29:417–26.

- Tanksley S D. 2004. The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *Plant Cell* 16:S181–S189.
- Thole JM, Nielsen E. 2008. Phosphoinositides in plants: novel functions in membrane trafficking. *Current Opinion in Plant Biology* 11:620-631.
- Torabinejad J, Donahue JL, Gunsekera BN, Allen-Daniels MJ, Gillaspay GE. 2009. VTC4 is a bifunctional enzyme that affects myo-inositol and ascorbate biosynthesis in plants. *Plant Physiology* 150:951–961
- Valluru R, Ende WV. 2011. Myo-inositol and beyond- emerging networks under stress. *Plant Science* 18:387–400
- Vicente AR, Saladi'e M, Rose JKC, Labavitch JM. 2007. The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:1435–1448
- Vincken JP, Schols HA, Oomen RJFJ, McCann MC, Ulvskov P, Voragen AGJ, Visser RGF. 2003. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology* 132:1781–1789.
- Vrebalov J, Pan IL, Arroyo AJM, McQuinn R, Chung M, Poole M, Rose J, Seymour G, Grandillo S, Giovannoni J. 2009. Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the tomato SHATTERPROOF gene TAGL1. *Plant Cell* 21:3041–62
- Warner J, Zhang TQ, Hao X. 2004. Effects of nitrogen fertilization on fruit yield and quality of processing tomatoes. *Canadian Journal of Plant Science* 84:865-871.
- Wellburn AR. 1994. The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*.144:307-313.
- Wien RBH. 1997. *The Physiology of Vegetable Crops*. 2nd Ed. New York: Labi Publishing, p. 662.
- Wilcox J, Premachandra G, Yound K, Raboy V. 2000. Isolation of 678 high seed inorganic P, low-phytate soybean mutants. *Crop Science* 40:1601–1605
- Wongkaew A, Nakasathien S, Srinives P. 2010. Isolation and characterization of D-myo-inositol-3-phosphate synthase from Mungbean (*Vigna radiata*). *Plant Molecular Biology Reporter* 28:122–127
- Xue H, Chen X, Li G. 2007. Involvement of phospholipid signaling in plant growth and hormone effects. *Current Opinion in Plant Biology* 10:483–489.
- Ye N, Zhu G, Liu Y, Zhang A, Li Y, Liu R, Shi L, Jia L, Zhang J. 2012. Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. *Journal of Experimental Botany* 63:1809–1822

Yoshida KT, Wada T, Koyama H, Mizobuchi-Fukuoka R, Naito S. 1999. Temporal and spatial patterns of accumulation of the transcript of myo-inositol-1-phosphate synthase and phytin-containing particles during seed development in rice. *Plant Physiology* 119:65–72

Yuan JS, Tiller KH, Al-Ahmad H, Stewart NR, Stewart CN. 2008. Plants to power: bioenergy to fuel the future. *Trends in Plant Science* 13:421–429.

Zambrano J, Moyeja J, Pacheco L. 1996. Efecto del estado de madurez en la composición y calidad de frutos de tomate. *Agronomía Tropical* 46:61-72.

Zhao TY, Martin D, Meeley RB, Downie B. 2004. Expression of the maize galactinol synthase gene family: (II) Kernel abscission, environmental stress and myo-inositol influences accumulation of transcript in developing seeds and callus cells. *Physiologia Plantarum* 121:647–655.

Zhou JR, Erdman JW. 1995. Phytic acid in health and disease. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 35:495–508

CAPÍTULO 3

Perfil metabólico primário de pericarpo e sementes durante o desenvolvimento de plantas de *Solanum lycopersicum* silenciadas para a *mio*-inositol-fosfato sintase (*MIPSI*)

3.1 INTRODUÇÃO

O *mio*-inositol é produto da enzima *mio*-inositol fosfato sintase (MIPS1) (E.C.5.5.1.4) que catalisa a conversão irreversível de D-Glicose-6-P para 1-L-*mio*-inositol-1-P. Em plantas, o *mio*-inositol ocupa papel de destaque no metabolismo fornecendo inositol e inositídeos envolvidos em processos metabólicos e em estruturas vegetativas (Goya *et al.*, 2011; Valluru e Ende, 2011).

Sequências codificadas de *MIPS* foram isoladas e caracterizadas de várias espécies vegetais, tais como: *Spirodela polyrrhiza* (Smart e Fleming, 1993), *Arabidopsis thaliana* (Johnson, 1994), *Citrus paradisi* (Abu-Abied e Holland, 1994), *Mesembryanthemum crystallinum* (Ishitani *et al.*, 1996), *Nicotiana tabacum* (Hara *et al.*, 2000), *Glycine Max* (Hegeman *et al.*, 2001), *Hordeum vulgare* (Larson e Raboy, 1999), *Oryza sativa* (Yoshida, 1999), *Zea mays* (Larson e Raboy, 1999), *Porteresia coarctata* (Majee *et al.*, 2004), *Sesamum indicum* (Chun *et al.*, 2003) e *Passiflora edulis f. flavicarpa* (Abreu e Aragão 2007).

As sequências codificadoras para *MIPS* são pertencentes a uma família multigênica, apresentando de uma a sete sequências, como em arroz e milho respectivamente (Yoshida *et al.*, 1999; Larson and Raboy, 1999). Os múltiplos genes de *MIPS* podem expressar de forma diferencial e sincronizada apresentando funções fisiológicas específicas (Abreu e Aragão 2007).

Transcritos de *MIPS* de diferentes espécies tem sido encontradas em óvulos, grãos de pólen, sementes em desenvolvimento, folhas de plantas cultivadas em condições de campo (Abreu e Aragão 2007), flores, cotilédones em germinação e embriões somáticos (Hegeman *et al.*, 2001). Porém, estas sequências são altamente conservadas. O alinhamento nucleotídeos de *MIPS* de *Passiflora* sp com 31 sequências de outras espécies vegetais, incluindo as solanáceas batata, tabaco e tomate, apresentou similaridade de nucleotídeos entre 74 a 86% (Abreu e Aragão 2007).

Os compostos derivados de *mio*-inositol participam de funções celulares cruciais em plantas como na transdução de sinais (Stevenson *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2007), transporte de membranas (Thole e Nielsen, 2008), exportação de mRNA (Okada e Ye, 2009), tolerância a estresse (Shevelava *et al.*, 1997) e armazenamento de fósforo (Thole e Nielsen, 2008; Stevenson-Paulik *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2008).

O *mio*-inositol pode ser usado para produzir o fosfatidilinositol (PtdIns) e derivados polifosfatos Ins (Kersting *et al.*, 2003) e solutos compatíveis tais como

galactinol, rafinose, família oligossacarídeos (OR), pinitol (Dastidar *et al.*, 2006) e biossíntese de ácido fítico e ácido fítico pirofosfatado (Horbowicz e Obendorf, 1994; Peterbauer e Richter, 1998), produto primário do ácido D-glucurônico, utilizado na síntese de uma variedade de substâncias pécicas da parede celular e os compostos não celulósicos e ácido ascórbico (Loewus e Murthy, 2000; Sasaki *et al.*, 1989; Lorence *et al.*, 2004).

Mutantes nulos da *MIPS* são letais, dessa forma as vias biossintéticas influenciadas pelo *mio*-inositol, produto da *MIPS*, necessitam de outras abordagens de estudo. O silenciamento de RNA, via RNAi possibilita a investigação de alterações na biossíntese e metabolismo de *mio*-inositol (Nunes *et al.*, 2006). Até o presente momento, plantas *MIPS* silenciadas não foram caracterizadas em detalhes, principalmente em estruturas reprodutivas de frutos carnosos.

Tomate (*Solanum lycopersicum*) é a principal planta modelo para o estudo do desenvolvimento de frutos carnosos e amadurecimento de frutas climatéricas (Carrari *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010).

O silenciamento da *mio*-inositol-fosfato sintase ao reduzir o conteúdo de *mio*-inositol, teoricamente, pode interferir nas vias de biossíntese de ácido fítico, oligossacarídeos e compostos pécicos. No entanto, elevados níveis de silenciamento podem comprometer a homeostase e manutenção de processos fisiológicos e reprodutivos resultando em alterações não esperadas e desvantajosas nas cultivares silenciadas (Keller *et al.*, 1998; Nunes *et al.*, 2006; Fernandes, 2009, Donahue *et al.*, 2010).

Frutos de plantas silenciadas para *MIPS1* de tomateiro possibilitam verificar o padrão de desenvolvimento de frutos e sementes, com produção de boa quantidade de material vegetal por planta, facilitando a amostragem e a experimentação. Neste estudo frutos de progênie T₂ com diferentes níveis de silenciamento da *MIPS1* via RNAi e sementes T₃ desses frutos foram avaliadas quanto o perfil metabólico primário durante diferentes estádios de desenvolvimento (10, 25, 50 e 60 dias após a antese) e monossacarídeos de parede celular em frutos maduros de 60 dias após a antese. Essa abordagem apontou comportamento alterado do conteúdo metabólico em plantas silenciadas e alvos influenciados pelo conteúdo de *mio*-inositol ou expressão da *MIPS*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal e condições experimentais

Foram utilizadas sementes T₂ de plantas de tomateiro ‘Moneymaker’ transgênico das linhagens MT 2.1, MT 2.2, MT 2.5, MT 2.8 e MT 2.9 contendo construção tipo *intron-hairpin-RNA* com fragmentos do gene *MIPS* de *Glycine max* (Δ GmMIPS) (Figura 1) indutora de silenciamento da sintase do *mio*-inositol-fosfato, de origem do vetor de transformação pMIPS1303 inserido na *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 (Figura 2). As sementes foram germinadas entre papel tipo Germitest[®] em câmara de crescimento por um período de 14 dias. A confirmação da manutenção do transgene foi realizada por PCR com iniciadores para o gene de resistência à higromicina em folhas de plantas contendo 15 dias. As plantas com transgenia confirmada foram avaliadas quanto o silenciamento da sintase do *mio*-inositol-fosfato (*MIPS1*) através de qRT-PCR (Figura 2) e selecionados seis linhas com diferentes níveis de expressão. Para linha foram obtidas seis réplicas biológicas através de enraizamento adventício utilizando ramos basais laterais. O enraizamento foi conduzido em tanque de 15 litros, em sistema hidropônico contendo solução nutritiva à ½ força pH 5,7 (Hoagland e Arnon, 1950). O experimento foi conduzido em blocos casualizados, em vasos de 15 litros contendo substrato Plantmax[®] (DDL Agro Indústria Ltda) em casa de vegetação com temperatura controlada a 25 °C até a frutificação.

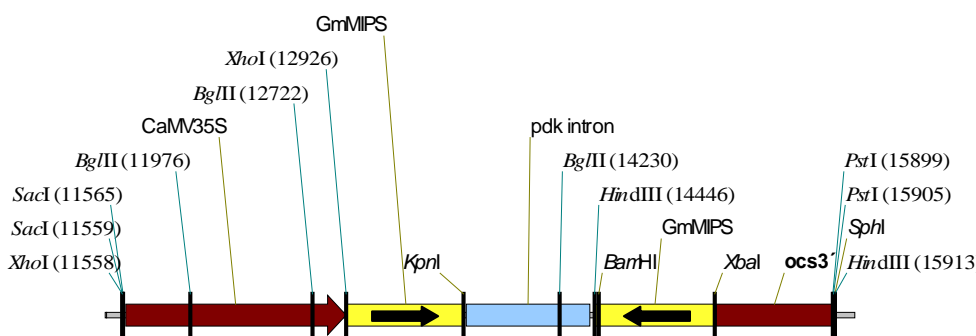


Figura 1. Detalhe do vetor de transformação: sequência indutora de *intron-hairpin-RNA* constituída de promotor *CaMV 35S*, seguido por fragmento de *GmMIPS* no sentido senso, *pdk* intron, repetição antissensa do fragmento de *GmMIPS* e *ocs* terminator.

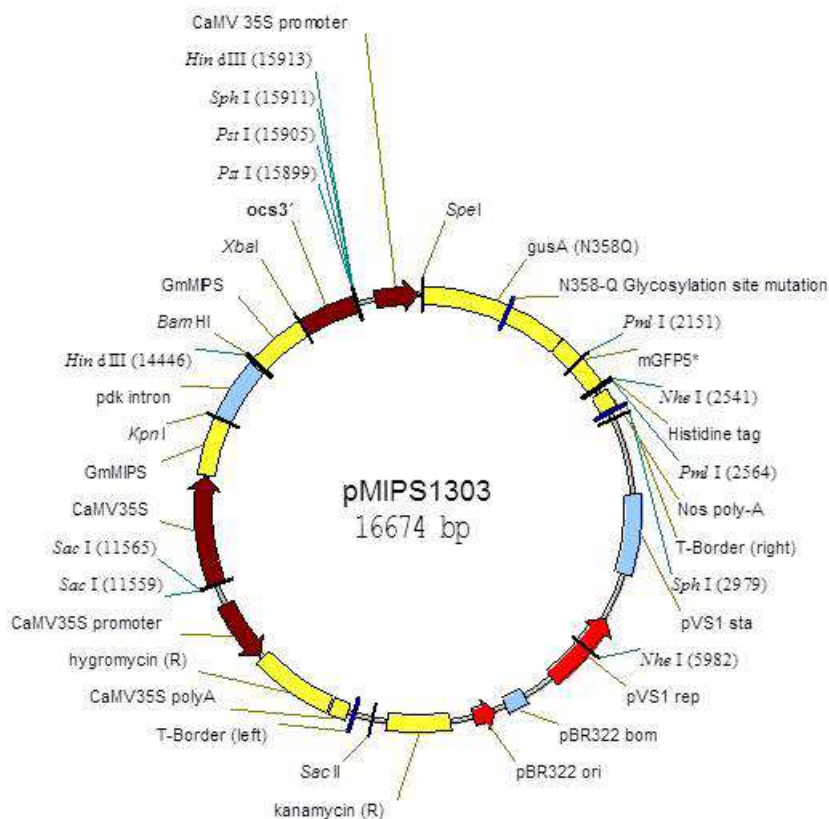


Figura 2. Vetor de transformação inserido na *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101.

3.2.2 Confirmação da integração do transgene por reação da polimerase em cadeia (PCR)

A análise de PCR foi realizada com DNA isolado de discos foliares de plantas da progênie transgênica e plantas-controle utilizando o método CTAB (Doyle e Doyle, 1990). A reação de PCR foi realizada em termociclador (PTC-100, MJ Investigador, EUA) com 50 µL de solução contendo 40 ng de DNA, 60 mM de Tris-SO₄ (pH 8,9), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM de MgCl₂, 250 nm de cada dNTP, 200 nM de cada iniciador 5 U de Taq polimerase (Invitrogen®). A reação foi incubada a 95 °C (5 min) e submetida a 35 ciclos de amplificação (95 °C durante 1 min, 50 °C durante 1 min, 72 °C durante 1 min) com um ciclo de alongamento final de 5 min a 72 °C durante 5 min.

Os iniciadores específicos para o gene de higromicina: ‘forward’ 5' GCTCCATACAAGCCAACCAC-3' e ‘reverse’ 5'-CGAAAAGTTCGACAGCGTCTC-3' foram utilizados para amplificar um fragmento a partir de DNA genômico de 670 pb. O DNA amplificado foi detectado em gel de agarose a 0,8% em solução contendo brometo de etídio 10 mg mL⁻¹. Os produtos da PCR foram visualizados colocando o gel no transiluminador UV e fotografados em sistema de documentação.

3.2.3 Desenho e teste dos oligonucleotídeos para realização da PCR quantitativa de transcrição reversa (RT-qPCR)

Sequência *MIPSI* GenBank No. AI491091 com expressão em folhas de tomateiro foi utilizada como molde para desenhar os oligonucleotídeos para RT-qPCR. O software PrimerExpress 2.0 (*Applied Biosystems*[®]) projetou os oligonucleotídeos com os seguintes critérios: temperatura de anelamento de 55 a 62 °C, comprimento do fragmento amplificado de 70 a 150 pb, comprimento dos oligonucleotídeos de 18 a 25 nucleotídeos e conteúdo guanina-citosina de 40% a 60%.

Quatro genes constitutivos com atividade gênica supostamente inalterada com o silenciamento da *MIPSI* foram testados a fim de determinar a referência interna para a normalização da expressão do gene. Os genes testados foram: actina (BT013524), β -6-tubulina (BT013153), fator de alongamento-1 α (BT013246), e adenina fosforibosiltransferase (APT1) (BT012816) (Alfenas-Zerbini, 2009).

A especificidade das quatro sequências *MIPSI* foi verificada na base de dados do NCBI utilizando o *Primer BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A especificidade de amplificação dos oligonucleotídeos *MIPSI* desenhados e normalizadores foi verificada por meio da análise das curvas de dissociação e por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% revelado com nitrato de prata. O oligonucleotídeo de *MIPSI* e normalizador que apresentou banda única e expressiva de plantas-controle e transgênicas de tomateiro foi escolhido para a RT-qPCR.

3.2.4 Análise da expressão do gene da *MIPSI* por RT-qPCR

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de tecido foliar com o Plant RNA Reagent Invitrogen[®] de acordo com as especificações do fabricante, tratado com DNase I Promega[®], quantificado em aparelho NanoDrop ND-1000 e ajustado a concentração de 250 ng μL^{-1} . O cDNA foi sintetizado com transcriptase reversa SuperScript[®] III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com as especificações do fabricante utilizando dois microgramas de RNA.

A reação de RT-qPCR foi realizada em placa óptica de 96 poços em aparelho ABI7500 *Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando o SYBR Green para monitorar a síntese de dsDNA. As reações contiveram 6 μL SYBR Green Master Mix reagent (Applied Biosystems[®], Foster City, CA, EUA), 1 μL de cDNA, 300 nM de cada oligonucleotídeo em um volume final de 12 μL . As

amplificações ocorreram em 50 °C por 2 minutos, 95 °C 10 por minutos e 39 ciclos de 95 °C a 15 s e 60 °C por 1 minuto. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

Os oligonucleotídeos utilizados para o RT-qPCR foram o MIPS1-4 ‘forward’ (5’-TGAAGGAGAGGGTAAGTTCCA-3’) e MIPS1-4 ‘reverse’ (5’-AAAGGAGCCTTGGTAA GATAACTG-3’) para verificar a expressão da *MIPS1* e o APT1 ‘forward’ (5’-CCATGAGGAAACCCAAGAAGT-3’) e APT1 ‘reverse’ (5’-CCTCCAGTCGCAATTAGATCAT-3’) para verificar a expressão do gene constitutivo *APT1*. Os níveis de expressão foram normalizados em relação ao gene *APT1* e a quantificação relativa da *MIPS* foi realizada pelo método comparativo de C_T ($\Delta\Delta C_T$) (Livak e Schmittgen, 2001).

3.2.5 Análise de metabólitos primários – extração em pericarpo de frutos e sementes

Os metabólitos primários foram analisados em pericarpos e sementes de frutos de tomateiro com seis níveis de silenciamento da *MIPS1* e planta-controle (WT) em seis réplicas por tratamento em diferentes fases de desenvolvimento dos frutos, conforme (Gillaspy *et al* 1993; Rohrmann *et al.*, 2011), sendo coletados nas fases com 10 (diferenciação celular), 25 (divisão celular e estágio verde maduro), 50 (expansão e estágio breaker +5), e 60 (amadurecimento e estágio breaker + 15) dias após a antese (DAA) (Figura 3), entre o horário de 11:00 à 13:00 horas, fragmentados em pedaços para imediato congelamento em nitrogênio líquido e liofilizados.

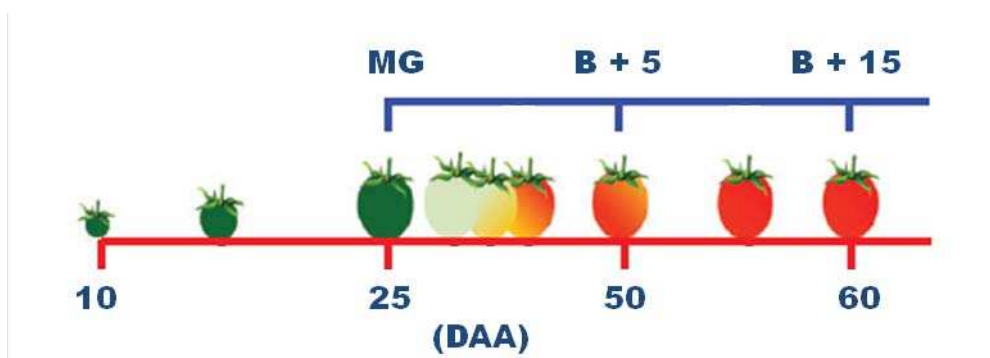


Figura 3. Desenho experimental utilizado para análise de perfil metabólico em pericarpos de frutos e sementes de plantas *MIPS* silenciadas. Frutos de plantas-controle e plantas *MIPS* silenciadas ‘Moneymaker’ foram coletados aos 10, 25, 50 e 60 dias após a antese (DAA) e assim em fases de maturação amplamente conhecidas em tomate como MG (mature Green), B + 5 (estágio breaker +5 dias) e B + 15 (estágio breaker + 15 dias) conforme previamente descrito (Rohrmann *et al.*, 2011).

Para analisar os metabólitos primários do pericarpo a epiderme foi separada do fruto após a liofilização. Para análise das sementes essas foram separadas da mucilagem

após a liofilização. A extração e derivatização foram realizadas segundo Lisec *et al.* (2006), com modificações.

A extração de metabólitos primários de pericarpo foi realizada com 30 mg de material liofilizado e pulverizado com nitrogênio líquido com a adição de metanol 100% (2 mL) como extrator acompanhado de ribitol (120 μL ; 0,2 mg mL^{-1} em H_2O), como padrão interno, a 2 °C e agitado vigorosamente em vórtex em tubos de vidro de 5 mL de capacidade com tampas rosqueáveis. Neste momento, a atividade enzimática foi paralisada. A extração ocorreu em incubação a 70 °C, por 15 min. Após incubação, foram adicionados 1500 μL de H_2O deionizada e autoclavada, agitando-se vigorosamente em vórtex e centrifugando-se a 4.000 rpm por 15 min. A partir da fase superior polar, contendo os metabólitos primários, foram coletadas duas alíquotas de 50 μL , cada em microtubos de 1,5 mL, as quais foram desidratadas completamente em *speedvac* sem aquecimento. Às amostras desidratadas foram adicionado gás de argônio e armazenadas em ultrafreezer (-80 °C), até o momento das análises.

A extração de metabólitos primários de sementes ocorreu com 5 mg de material liofilizado e pulverizado com nitrogênio líquido com a adição de metanol 100% (1,4 mL) como extrator acompanhado de ribitol (60 μL ; 0,2 mg mL^{-1} em H_2O), como padrão interno, a 2 °C e agitado vigorosamente em vórtex. Neste momento a atividade enzimática é paralisada e o ribitol representa o padrão interno quantitativo da extração.

Em seguida, em cada amostra foi adicionado 750 μL de clorofórmio 100% e 750 μL de H_2O deionizada estéril. A extração ocorreu em incubação de 15 minutos a 70 °C. Após incubação as amostras foram centrifugada a 4000 rpm por, 15 min, e a fase sobrenadante polar com volume de 1200 μL foi transferida para novo tubo, e nesse adicionado 750 μL de clorofórmio 100% e 1500 μL de H_2O deionizada estéril e agitado por inversão por 15 segundos cada amostra. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 min.

A partir da fase superior polar, contendo os metabólitos primários, foram coletadas duas alíquotas de 200 μL as quais foram desidratadas completamente em *speedvac* sem aquecimento. Às amostras desidratadas foram adicionado gás de argônio e armazenadas em ultrafreezer (-80 °C), até o momento das análises.

3.2.5.1 Derivatização da fase polar de pericarpos e sementes

As amostras acondicionadas em ultrafreezer foram red desidratadas durante 15 min em *speedvac* antes das análises. Às amostras foi adicionado 40 μL de

metoxiaminohidroclorido (30 mg mL⁻¹ em piridina). Um tubo contendo igual volume de metoxiaminohidroclorido foi utilizado como branco e, em paralelo, foi conduzido uma extração de folhas de *Arabidopsis thaliana* para controle do procedimento. As amostras e controles foram incubadas durante 2 horas a 37 °C, sob agitação de 950 rpm. Em seguida adicionou-se para as amostras de pericarpo 120 µL e para as amostras de sementes 70 µL de uma solução contendo 1 mL N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) e 20 µL mL⁻¹ de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) e incubou-se a 37 °C, sob agitação de 950 rpm, por 30 minutos. O volume de 100 µL foi transferido para os vials para serem aplicados no GC-MS.

3.2.5.2 Análise de dados

Os espectros de massa foram analisados pelo programa TAGFINDER (Luedemann *et al.*, 2008) alimentado com bibliotecas de índice de tempos de retenção e espectros de fragmentação dos metabólitos primários. Depois de identificados e selecionados os valores relativos dos metabólitos foram normalizados pelo padrão interno ribitol, pelo peso da amostra e pela média do valor relativo da planta-controle WT. Os valores foram analisados pelo Teste- *t* Student ($p < 0.05$) e transformados em log₂ e apresentados em *heatmaps*.

3.2.6 Metabólitos de parede celular

3.2.6.1 Extração e remoção de amido

A extração e remoção de amido ocorreu em 500 mg de material vegetal liofilizado de pericarpo de frutos contendo 60 DAA em seis replicatas por tratamento. Para isto, o pulverizado foi homogeneizado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado a 14.000 rpm durante 10 minutos. Ao sedimento foi adicionado clorofórmio : metanol (1:1, v/v), durante 5 min em agitação de 950 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido três vezes ou até completa remoção dos pigmentos. Após esta etapa, o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de acetona, centrifugado, e seco sob vácuo.

A remoção do amido da parede celular extraída ocorreu por incubação com 40 unidades de α -amilase por amostra (Roche Applied Science[®]) em 2 mL de Tris-HCl pH 7,0 durante 24 horas. Em seguida a parede celular foi precipitada mediante centrifugação de 14.000 rpm por 20 minutos e lavada com água deionizada para

remoção da glicose e amido e centrifugado 14.000 rpm por 10 minutos para descarte do sobrenadante; esse processo foi repetido três vezes. A parede celular foi precipitada com etanol a 70%, adicionando-se volume apropriado de etanol a 96% à mistura de reação e uma última lavagem e centrifugação foi realizada com acetona, resultando na parede celular que foi seca sob vácuo.

3.2.6.2 Hidrólise ácida para quantificação de monossacarídeos neutros

Material de parede celular (1 mg) foi incubado em 250 mL de 2 M ácido trifluoroacético (TFA) em um tubo de ensaio com tampa rosqueável de borosilicato durante 1 hora a 121 °C. A suspensão foi diluída com 300 mL de 2-propanol e evaporada a 40 °C, procedimento esse repetido três vezes. Em seguida o sedimento foi ressuspenso em 200 mL de água sob agitação e sonicação por 10 minutos e centrifugadas. Os resíduos insolúveis foram utilizados para medir o teor de celulose através do método de antrona.

A solução hidrolisada foi utilizada para analisar a composição de açúcares neutros via acetatos de alditol, determinada por GC-MS de acordo Blakeney *et al.* (1983).

3.2.6.3 Açúcares neutros de parede celular

O volume de 100 µL do hidrolisado foi evaporado a fim de preparar o alditol acetatos. Redução de alditois foi conseguida por ressuspensão do sedimento em agente de redução (250 µL de borohidreto de sódio em 1 M de hidróxido de amônio), adicionado 30 mg de *mio*-inositol por amostra como padrão interno e incubando durante 1 h, à temperatura ambiente. A mistura foi neutralizada pela a adição de 20 µL de ácido acético glacial e em seguida lavou-se cuidadosamente com 250 µL ácido acético: metanol (1:9, v/v) seguido de evaporação a 40 °C, o processo de lavagem e evaporação foi realizado três vezes, seguido por lavagens de 250 µL metanol 100% e evaporação a 40 °C também realizado por três vezes. A mistura foi acetilada pela adição de 250 µL de anidrido acético e 50 mL de piridina e incubados durante 20 minutos a 121 °C. A reação foi lavada com 200 µL tolueno e evaporado por duas vezes. A limpeza seguiu por adição de 500 µL de água destilada e 500 µL de cloreto de metileno e agitado vigorosamente. A fase apolar inferior foi coletada, evaporada e ressuspendida em 100 µL de acetona. A composição de monossacarídeos hidrolisados foi determinada por GC-MS em um sistema Series GC Agilent 6890 equipado com 5975B inerte XL MSD e

conectado a uma coluna capilar de sílica SP-2380 (30 m x 0,25 mm i.d. x 20 µm de espessura de filme; Supelco).

3.2.6.4 *Quantificação de celulose da parede celular*

A celulose, presente no sedimento da hidrólise ácida por TFA para monossacarídeos, foi hidrolisada com a adição de ácido sulfúrico 72%, durante 30 minutos em temperatura ambiente e agitação a 950 rpm, seguido de sonicação à temperatura ambiente, por 15 minutos. Ao final desta etapa foi adicionado 450 µL de água deionizada e agitado vigorosamente, seguido por centrifugação a 3.700 rpm durante 5 minutos.

A solução hidrolisada foi analisada pelo teste de antrona, para isto 200 µL foram utilizados para duas replicatas do ensaio. O teste de antrona (Dische, 1962) foi realizado em 100 µL do hidrolisado de celulose e adicionado 200 µL do reagente de anthrona 0,2%, aquecido em banho Maria fervente durante 5 min. A leitura foi realizada em 200 µL em placa do tipo ELISA em espectrofotômetro em OD_{640nm}. O total de hexose foi calculado através de curva padrão de glicose convertido para o total do extrato e total em mg do material extraído. O resultado foi dividido pelo fator 1.11 para acomodar a adição de água durante a conversão do polímero (162 g mol⁻¹) a glicose (180 g mol⁻¹). O resultado foi expresso em µg mg⁻¹ de parede celular (Updegraff, 1969).

3.2.6.5 *Quantificação de ácidos urônicos*

A análise de identificação e quantificação de ácidos urônicos ocorreu conforme ensaio de bifênol (*m*-hidróxi-bifênol). Para isto, amostras de 50 µL do hidrolisado para monossacarídeos (hidrólise TFA), contiveram a adição de 50 µL de água deionizada, 10 µL de reagente de sulfamato (19,44 g de ácido sulfâmico dissolvido em algumas gotas de KOH 24%, volume para 50 mL com água desionizada e pH 1,6), 600 µL tampão borato (0,0125 M borato de sódio (Na₂B₄O₇) em ácido sulfúrico concentrado), agitado vigorosamente e incubado durante 5 minutos à 121 °C, resfriado em temperatura ambiente durante 10 minutos. As amostras foram divididas em duas alíquotas, uma de 200 µL para o branco e o restante de 510 µL para a reação de bifênol. Na alíquota de 510 µL foi adicionado 15 µL solução de bifênol (0,15% em NaOH 0,5%). Após 10 minutos, as amostras com reagente de bifênol foram dispostas em duplicatas, 200 µL cada e 200 µL do branco de cada amostra. A absorbância das amostras da placa foi lida em comprimento de onda de 540 nm e a concentração foi calculada através de curva

padrão com ácido glucurônico e fatores de diluição, sendo os resultados expressos em ng mg^{-1} de parede celular (Filisetti-Cozzi e Carpita, 1991).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Confirmação da manutenção do transgene por análise de PCR em plantas T₂ e análise do nível de expressão de *MIPS1* por RT-qPCR

A análise de PCR, utilizando iniciadores para o gene de resistência a higromicina, confirmou a presença do transgene $\Delta GmMIPS$ (670 pb) no DNA extraído de folhas de plantas T₂. A expressão diferencial de *MIPS1* foi encontrada no cDNA de folhas dos transgenes da geração T₂ avaliados. O gene normalizador *APT1* se apresentou mais eficiente como controle interno, sendo utilizado em todas as análises de RT-qPCR. Dentre as plantas transgênicas que apresentaram silenciamento foram selecionados 6 níveis de expressão (MT 8.25 = 80%, MT 2.6 = 40%, MT 7.13 = 30%, MT 1.1 = 20%, MT 7.2 = 5% e MT 1.2 = 4%) (Figura 2).

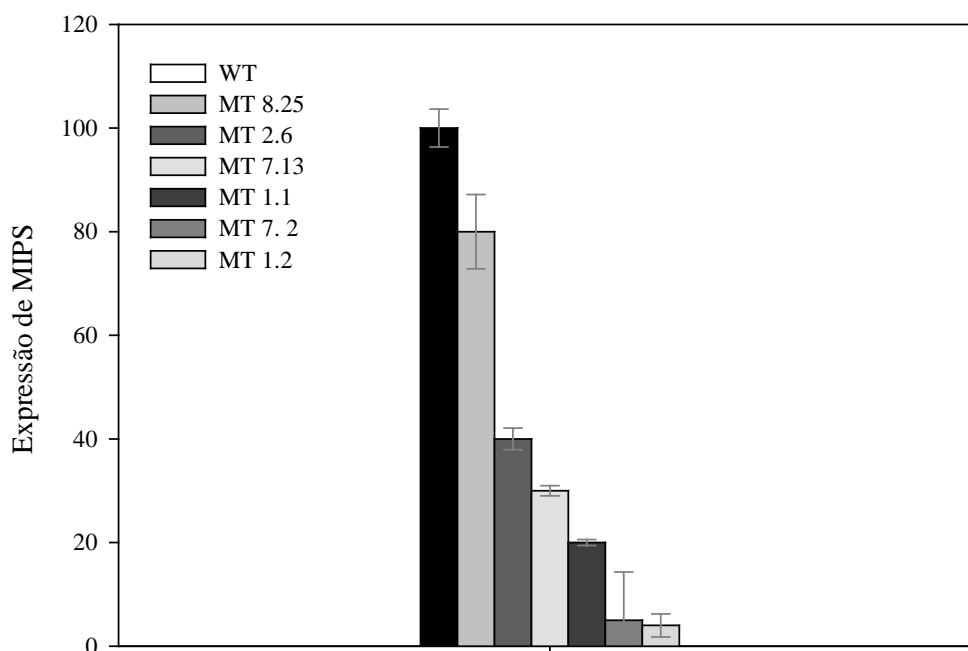


Figura 3. Análise da expressão do gene da *MIPS1* em folhas de plantas-controle (WT) e plantas transgênicas da progênie T₂ de tomateiro MoneyMaker. Barras indicam o erro padrão (n = 3).

3.3.3 Perfil metabólico de sementes de tomate em plantas da progênie T₂ silenciada

Houve influência do silenciamento no perfil metabólico em sementes de frutos com 10 dias após a antese (DAA) de plantas silenciadas quando comparado com a WT. O conteúdo de aminoácidos, ácidos orgânicos e intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) foi reduzido em sementes com 10DAA. Os açúcares glicose,

sacarose e rafinose apresentaram acúmulo quando comparado com a WT. O conteúdo de *mio*-inositol não apresentou diferença estatística entre os níveis de silenciamento de *MIPSI* e a WT, apesar da visível redução entre os níveis. O açúcar álcool galactinol reduziu, enquanto o glicerol aumentou (Figura 4).

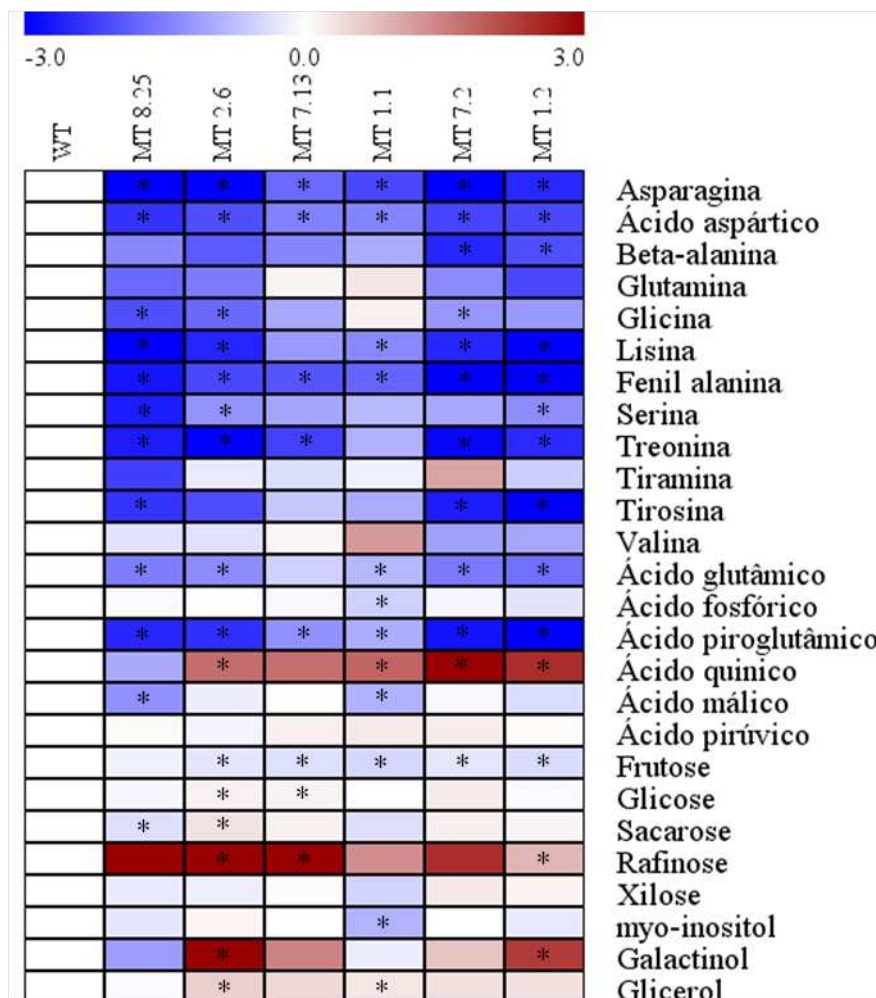


Figura 4. Efeito do silenciamento na expressão de *MPISI* no perfil metabólico de sementes de frutos com 10 dias após a antese. Metabólitos foram identificados em sementes de plantas-controle (WT) e plantas apresentando seis níveis de silenciamento da expressão de *MIPSI*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à média das plantas WT e transformados em log2. Diferentes tons de vermelho e azul expressam a extensão das mudanças nos níveis dos metabólitos segundo a barra de referência. Os asteriscos indicam diferença significativa pelo Teste t de Student ($p > 0.05$) em comparação com os valores obtidos para o WT ($n = 6$). Os valores absolutos encontram-se nos Dados Suplementares.

Em sementes de 25 DAA, os frutos verdes estão em fase de divisão celular e o perfil metabólico apresentou outro comportamento comparado ao de 10 DAA (Figura 5). Os aminoácidos em sua maioria apresentaram comportamento semelhante ao WT, com exceção da asparagina, com conteúdo reduzido, lisina e tiramina que apresentaram acúmulo. Os ácidos orgânicos apresentaram diferença em acúmulo de metabólitos, em especial nicotinato e quinato. Os intermediários do ciclo TCA apresentaram diferença

novamente em malato no acúmulo do metabólito. Verificou-se também o acúmulo para frutose, glicose e sacarose. O teor de xilose diminuiu, possivelmente influenciada pelo nível de inositol. Os açúcares álcool continuaram sua tendência de acúmulo em glicerol.

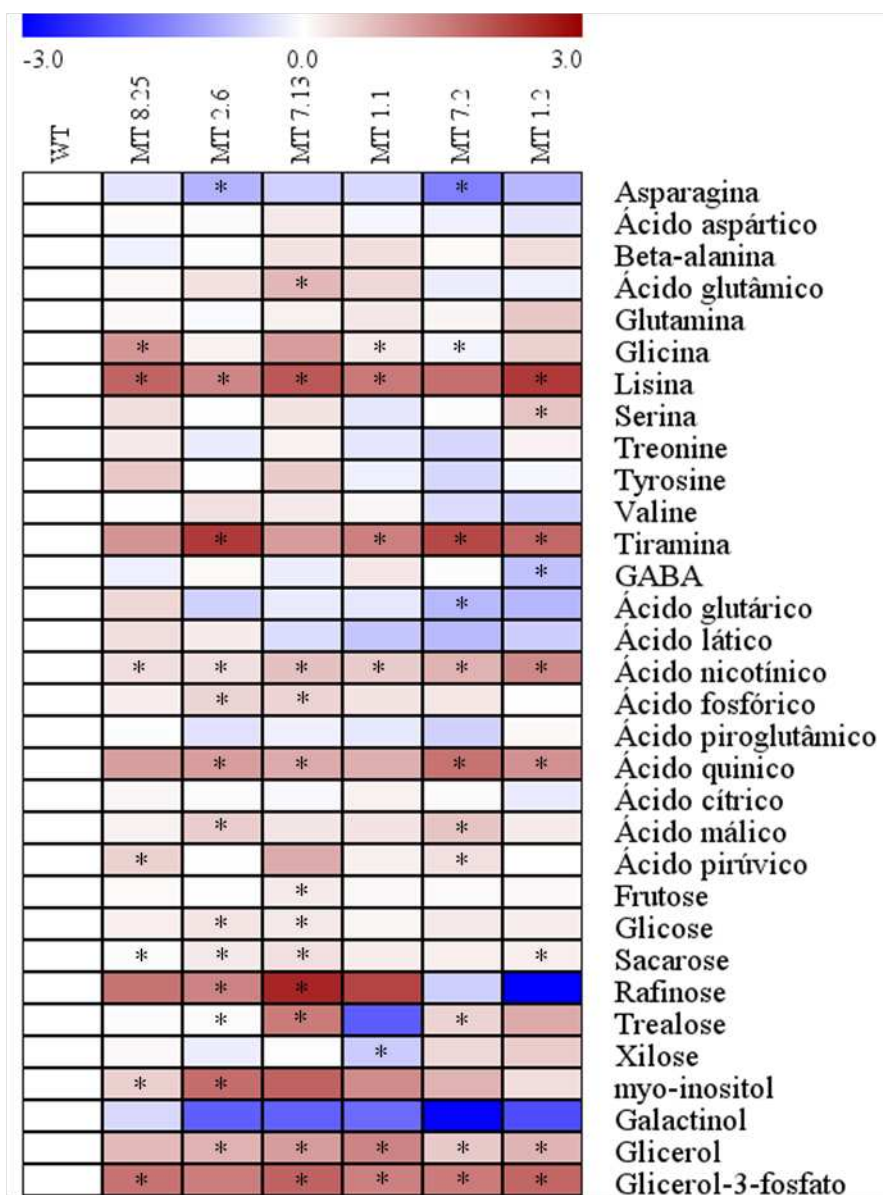


Figura 5. Efeito do silenciamento na expressão de *MPIS1* no perfil metabólico de sementes de frutos com 25 dias após a antese. Metabólitos foram identificados em sementes de plantas-controle (WT) e plantas apresentando seis níveis de silenciamento da expressão de *MIPS1*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à média das plantas WT e transformados em log2. Diferentes tons de vermelho e azul expressam a extensão das mudanças nos níveis dos metabólitos segundo a barra de referência. Os asteriscos indicam diferença significativa pelo Teste *t* de Student ($p > 0.05$) em comparação com os valores obtidos para o WT ($n = 6$). Os valores absolutos encontram-se nos Dados Suplementares.

Em sementes de frutos com 50 DAA, em que os frutos se encontram em fase de expansão e início da maturação, caracterizado pelo estágio “breaker”, verificou-se em plantas silenciadas, novamente um padrão de redução nos níveis metabólitos (Figura 5)

sugerindo uma redução na atividade metabólica em plantas silenciadas. Verificou-se uma redução significativa dos níveis de vários aminoácidos, entre eles a asparagina, aspartato, glicina, isoleucina, lisina, ornitina, fenilalanina, glutamato, piroglutamato, serina, e tirosina. Os ácidos orgânicos butirato, fosforato, e quinato apresentaram redução; enquanto isobutirato, lactato, nicotinato apresentaram acréscimo no conteúdo.

Os intermediários do ciclo TCA ácido cítrico, ácido fumárico e ácido málico apresentaram redução do conteúdo, quando comparado com a WT. Houve redução nos níveis dos açúcares glicose, sacarose, galactose e rafinose, enquanto frutose e trealose apresentaram acréscimo podendo ser em resposta da redução da conversão de glicose-6P a *mio*-inositol, estimulando a síntese de frutose e trealose.

Os açúcares álcool, o *mio*-inositol e *mio*-inositol-1P apresentaram redução em dois níveis; o glicerol continuou seu padrão de acúmulo apresentando cinco níveis significativos, enquanto o galactinol, glicerol-3-P e o benzil-álcool acumularam (Figura 6).

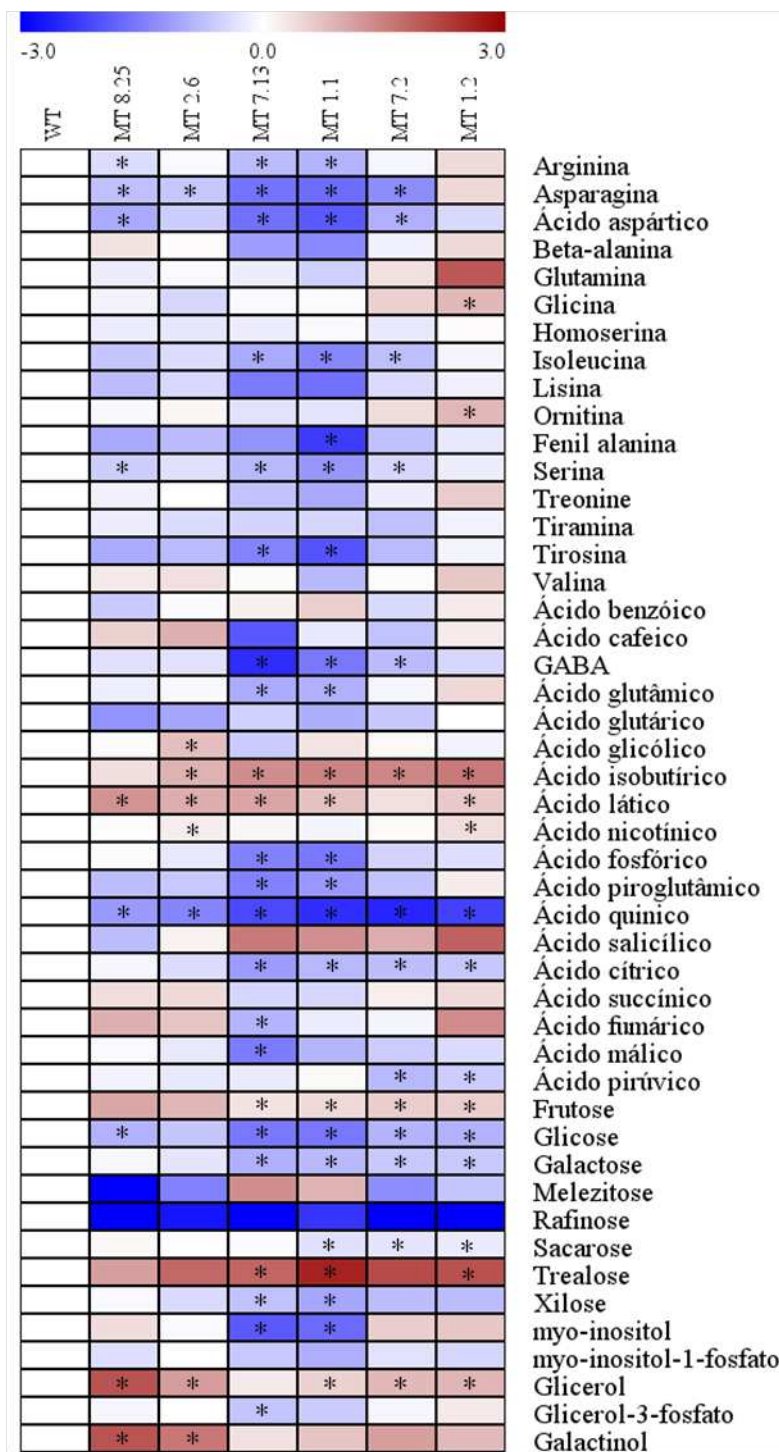


Figura 6. Efeito do silenciamento na expressão de *MPIS1* no perfil metabólico de sementes de frutos com 50 dias após a antese. Metabólitos foram identificados em sementes de plantas-controle (WT) e plantas apresentando seis níveis de silenciamento da expressão de *MIPSI*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à média das plantas WT e transformados em log2. Diferentes tons de vermelho e azul expressam a extensão das mudanças nos níveis dos metabólitos segundo a barra de referência. Os asteriscos indicam diferença significativa pelo Teste t de Student ($p > 0.05$) em comparação com os valores obtidos para o WT ($n = 6$). Os valores absolutos encontram-se nos Dados Suplementares.

Sementes com 60 dias após a antese coletadas de frutos em estágio maduro apresentam padrão de aminoácidos ainda mais reduzido quando comparado com o

padrão em sementes de 50DAA, sendo mais contrastante aos valores de aminoácidos encontrados em plantas-controle. Essa redução significativa foi encontrada em várias das diferentes linhagens silenciadas (Figura 7). Os ácidos orgânicos apresentam redução sendo mais expressivo nos conteúdos de lactato, nicotinato e quinato. Os intermediários do ciclo TCA apresentam redução em fumarato, malato e succinato. Em relação aos sacarídeos, apenas a sacarose apresentou redução. O glicerol reduziu em quatro linhagens silenciadas, enquanto o galactinol aumentou em três linhagens (Figura 7).

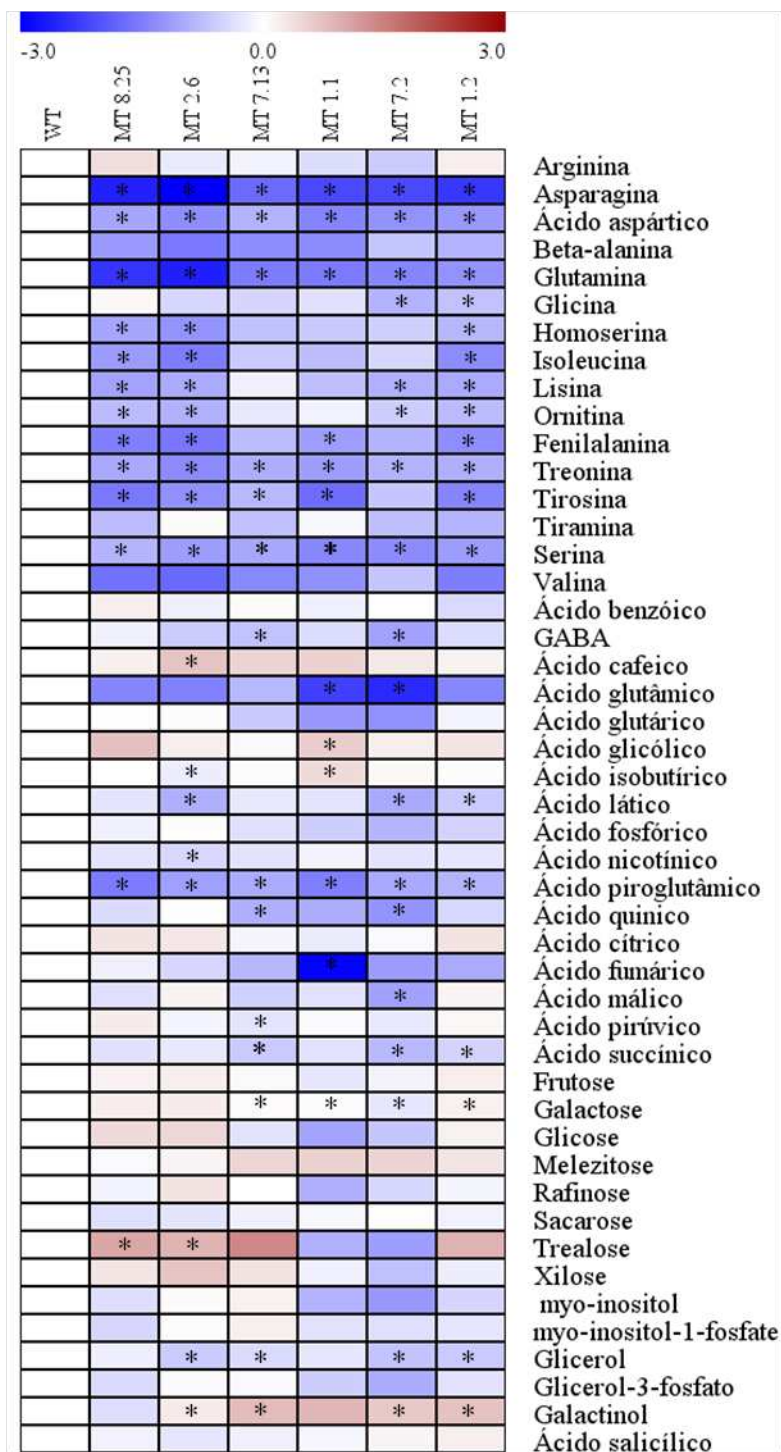


Figura 7. Efeito do silenciamento na expressão de *MPIS1* no perfil metabólico de sementes de frutos com 60 dias após a anthesis. Metabólitos foram identificados em sementes de plantas-controle (WT) e plantas apresentando seis níveis de silenciamento da expressão de *MPIS1*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à média das plantas WT e transformados em log2. Diferentes tons de vermelho e azul expressam a extensão das mudanças nos níveis dos metabólitos segundo a barra de referência. Os asteriscos indicam diferença significativa pelo Teste t de Student ($p > 0.05$) em comparação com os valores obtidos para o WT ($n = 6$). Os valores absolutos encontram-se nos Dados Suplementares.

3.3.4 Alterações metabólicas em pericarpo de frutos de plantas de tomate em linhagens *MIPSI* silenciadas.

Em pericarpo de frutos 10DAA em linhagens silenciadas, o padrão geral da abundância de metabólitos foi reduzido. Em frutos, os metabólitos também apresentaram redução, porém menos contrastante ao encontrado em sementes da mesma idade.

Os ácidos orgânicos não seguiram a tendência de redução apresentada nos demais metabólitos, e apresentaram acúmulo em benzoato, lactato, nicotinato e quinato. Os intermediários do ciclo TCA, por sua vez, seguiram o comportamento de redução de metabólitos encontrado nos aminoácidos, apresentando redução em fumarato e malato. Os açúcares apresentaram acúmulo no conteúdo em xilose, maltose, rafinose e sacarose. Houve acúmulo nos níveis de galactinol e lactitol (Figura 8).

Em pericarpo de frutos de 25 DAA de plantas silenciadas verifica-se redução significativa no conteúdo dos aminoácidos: ácido aspártico, beta-alanina, guanidina, glutamina, glicina, isoleucina, lisina, ornitina, prolina, serina, treonina e tirosina (Figura 9). Os ácidos orgânicos deidroascorbato, ácido láctico, ácido nicotínico, ácido quinico, ácido málico e ácido pirúvico, por sua vez, apresentaram acúmulo comparado com a WT, assim como os açúcares glicose, maltose, manose, rafnose, sacarose xilose e o açúcar álcool glicerol. O *mio*-inositol apresentou redução significativa em uma linhagem silenciada (Figura 9).

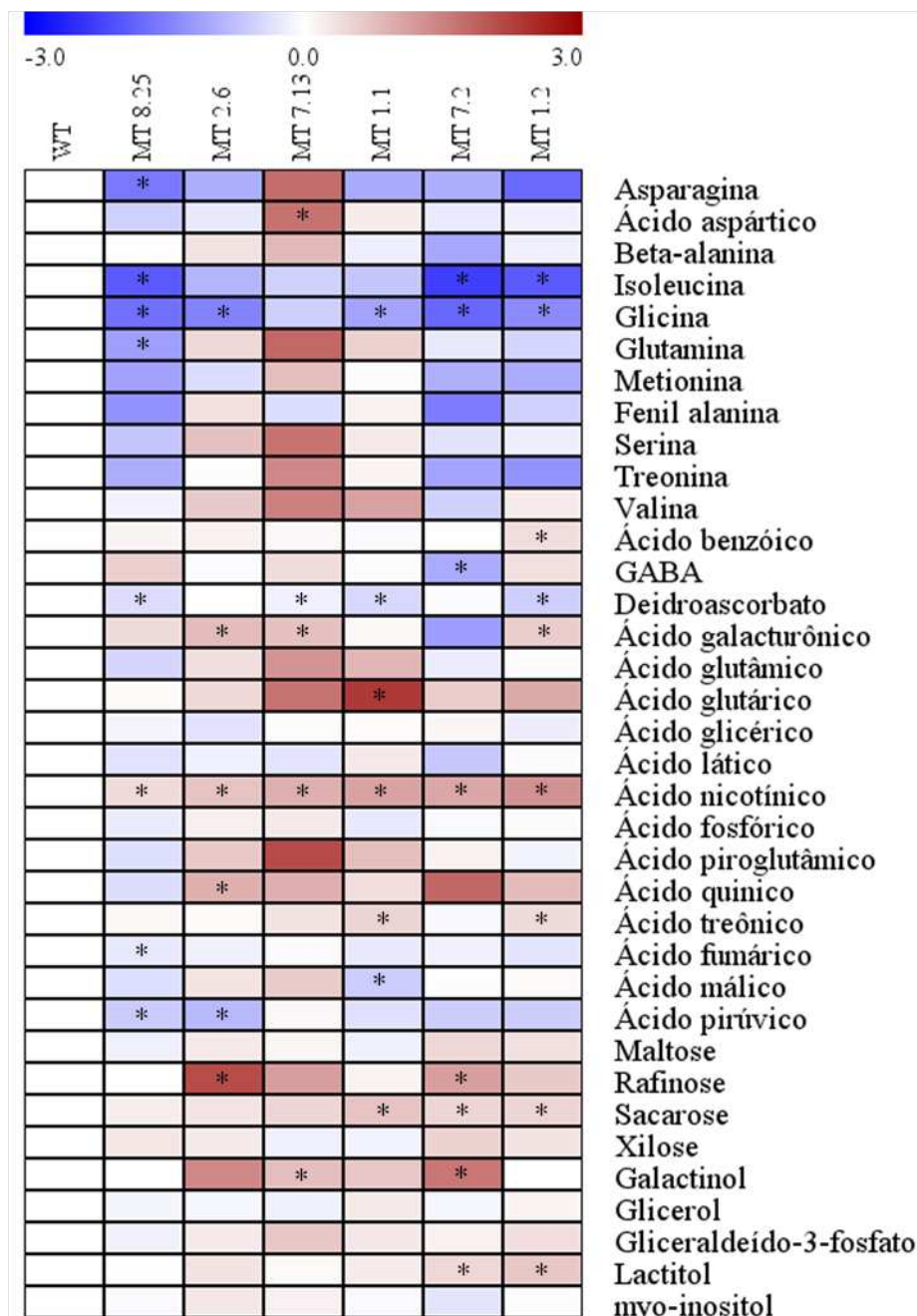


Figura 8. Efeito do silenciamento na expressão de *MPIS1* no perfil metabólico de pericarpo de frutos com 10 dias após a antese. Metabólitos foram identificados em pericarpos de plantas-controle (WT) e plantas apresentando seis níveis de silenciamento da expressão de *MIPS1*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à média das plantas WT e transformados em log₂. Diferentes tons de vermelho e azul expressam a extensão das mudanças nos níveis dos metabólitos segundo a barra de referência. Os asteriscos indicam diferença significativa pelo Teste t de Student ($p > 0.05$) em comparação com os valores obtidos para o WT ($n = 6$). Os valores absolutos encontram-se nos Dados Suplementares.

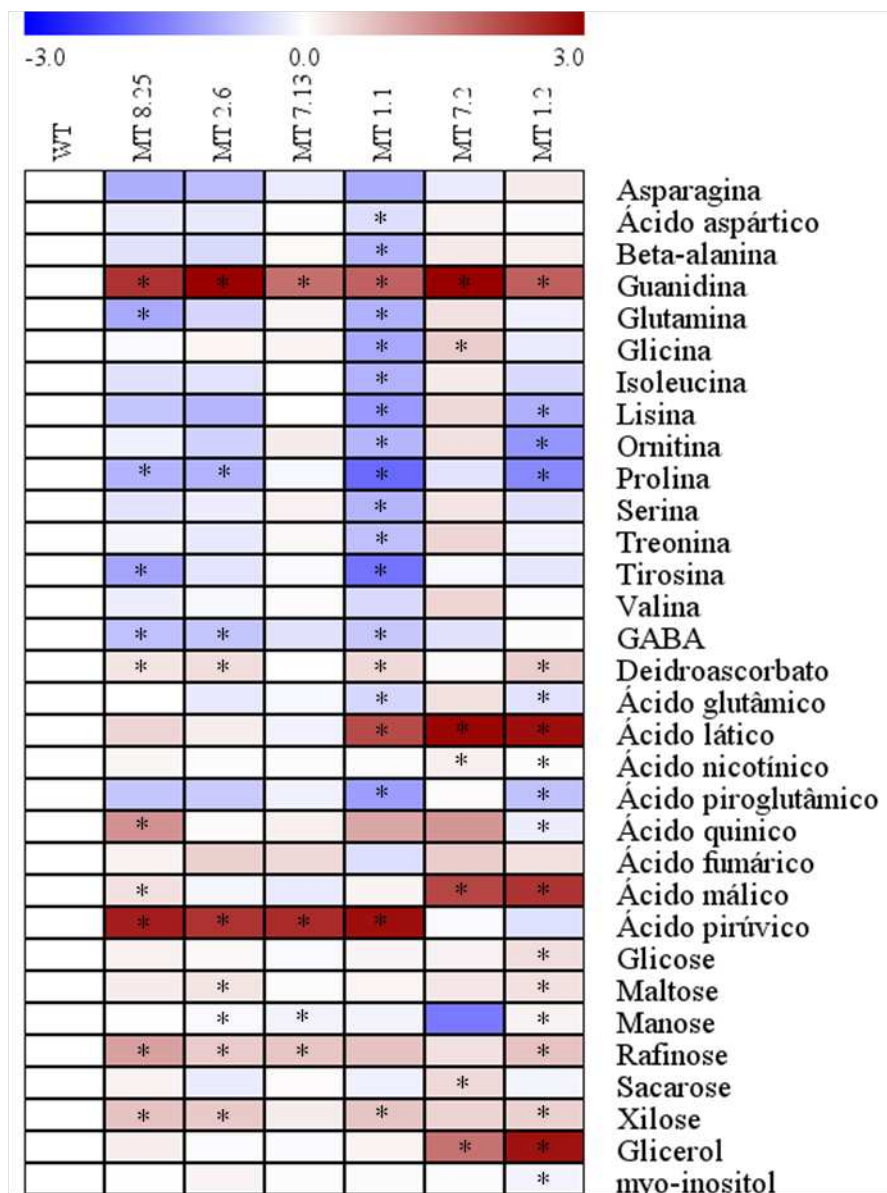


Figura 9. Efeito do silenciamento na expressão de *MPIS1* no perfil metabólico de pericarpo de frutos com 25 dias após a antese. Metabólitos foram identificados em pericarpos de plantas-controle (WT) e plantas apresentando seis níveis de silenciamento da expressão de *MIPS1*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à média das plantas WT e transformados em log2. Diferentes tons de vermelho e azul expressam a extensão das mudanças nos níveis dos metabólitos segundo a barra de referência. Os asteriscos indicam diferença significativa pelo Teste t de Student ($p > 0.05$) em comparação com os valores obtidos para o WT ($n = 6$). Os valores absolutos encontram-se nos Dados Suplementares.

Em pericarpos de frutos com 50 DAA, poucos aminoácidos apresentaram diferença, foram eles: ácido aspártico, glutamina, glicina, metionina, serina e treonina, essa diferença ocorreu no acúmulo e em poucas linhagens (Figura 10). Os ácidos orgânicos seguiram tendência de acúmulo quando observado os conteúdos de deidroascorbato e nicotinato, enquanto fosforato apresentou redução. Os intermediários do ciclo TCA também tenderam para o acúmulo. Os açúcares maltose, trealose e xilose

apresentaram acúmulo, enquanto sacarose reduziu. Os açúcares álcool galactinol glicerol também apresentaram acúmulo, enquanto o *mio*-inositol tendeu para a redução apesar de não apresentar diferença estatística (Figura 10).

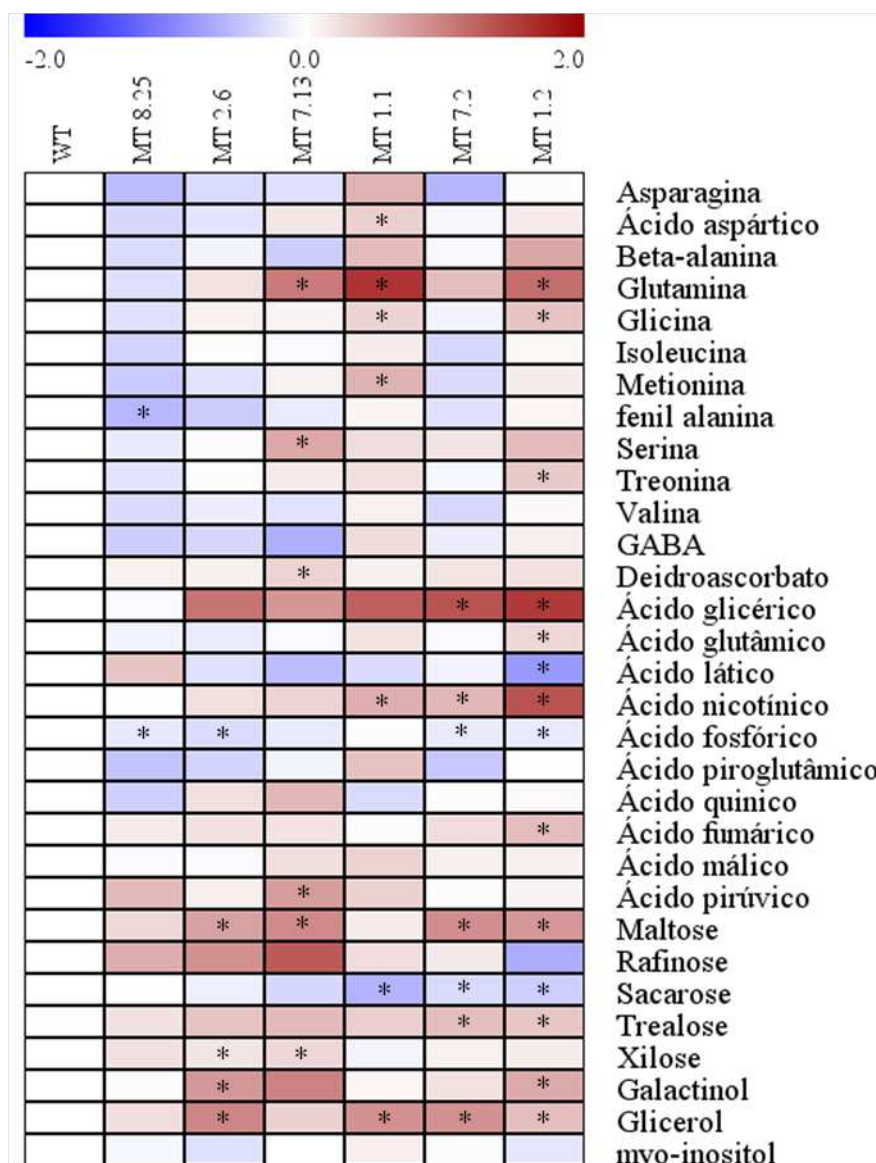


Figura 10. Efeito do silenciamento na expressão de *MPIS1* no perfil metabólico de pericarpo de frutos com 50 dias após a antese. Metabólitos foram identificados em pericarpos de plantas-controle (WT) e plantas apresentando seis níveis de silenciamento da expressão de *MIPS1*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à média das plantas WT e transformados em log2. Diferentes tons de vermelho e azul expressam a extensão das mudanças nos níveis dos metabólitos segundo a barra de referência. Os asteriscos indicam diferença significativa pelo Teste t de Student ($p > 0.05$) em comparação com os valores obtidos para o WT ($n = 6$). Os valores absolutos encontram-se nos Dados Suplementares.

Em pericarpos de frutos com 60 DAA, ao comparar o perfil de aminoácidos entre as linhagens silenciadas e a WT, esses apresentaram acúmulo de um a quatro linhagens de silenciamento (Figura 11), verificou-se em 50 e 60 DAA possuem um padrão alterado no aumento da abundância de aminoácidos. Em relação aos ácidos

orgânicos, apenas nicotinato apresentou modificação ao comprar com a WT, apresentando redução. Os intermediários do ciclo TCA, ácido fumárico e ácido málico, apresentaram redução quando comparado com a WT, enquanto os açúcares isomaltose, ramnose e xilose apresentam acréscimo, enquanto maltose, sacarose e rafinose reduziram. Os açúcares álcool o galactinol e o *mio*-inositol apresentaram acúmulo em relação à WT.

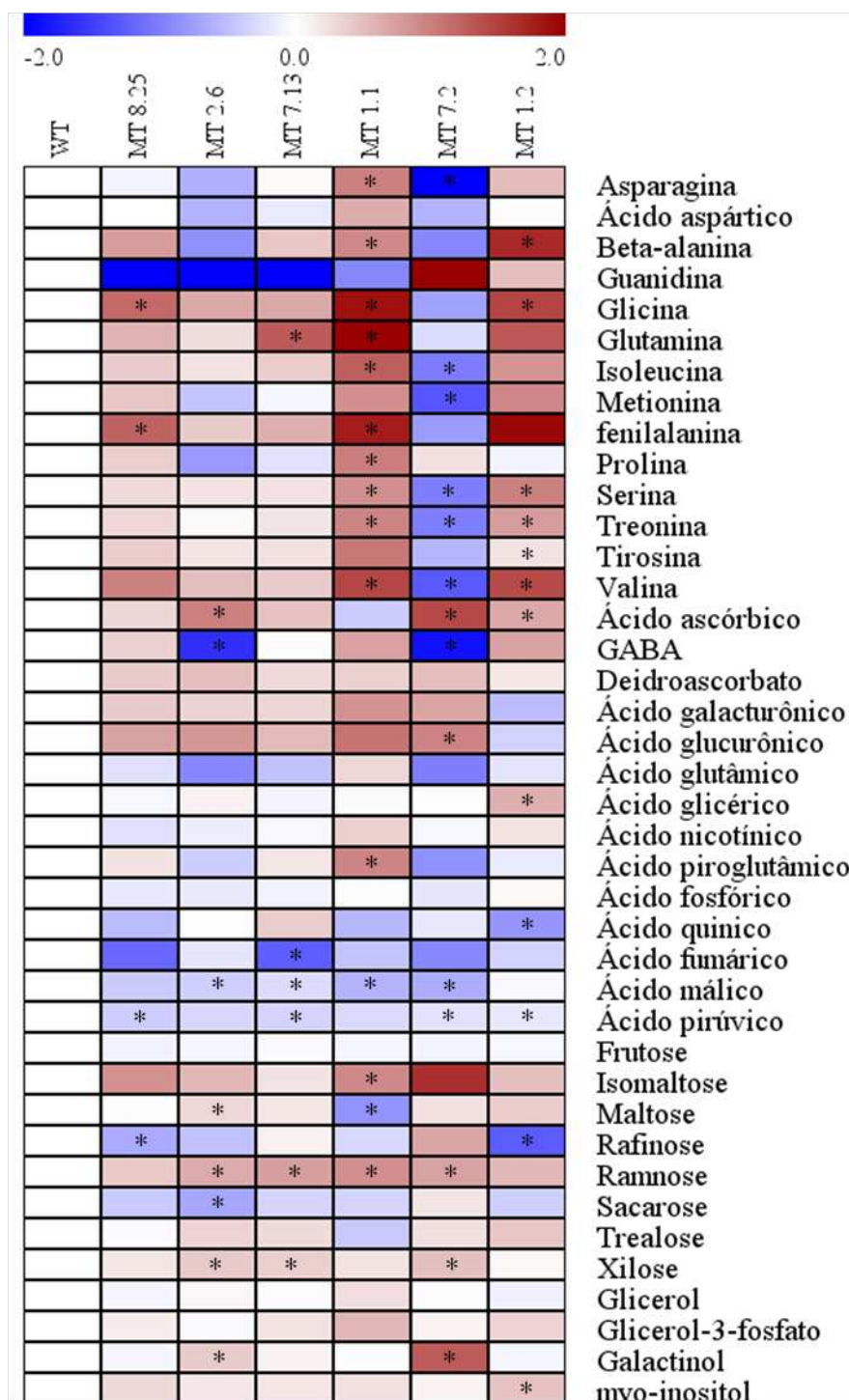


Figura 11. Efeito do silenciamento na expressão de *MPIS1* no perfil metabólico de pericarpo de frutos com 60 dias após a antese. Metabólitos foram identificados em pericarpos de plantas-controle (WT) e plantas apresentando seis níveis de silenciamento da expressão de *MPIS1*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à média das plantas WT e transformados em \log_2 . Diferentes tons de vermelho e azul expressam a extensão das mudanças nos níveis dos metabólitos segundo a barra de referência. Os asteriscos indicam diferença significativa pelo Teste t de Student ($p > 0.05$) em comparação com os valores obtidos para o WT ($n = 6$). Os valores absolutos encontram-se nos Dados Suplementares.

3.3.5 Açúcares neutros de parede celular

Os açúcares neutros de parede celular quando comparados entre as plantas-controle e as linhagens silenciadas em frutos com 60 DAA, a glicose e fucose apresentaram acúmulo significativo no maior nível de silenciamento MT 1.2 e os ácidos urônicos apresentaram acúmulo em MT 1.1 (Figura 12). A xilose apresentou tendência a redução na linhagem MT 1.2, galactose e ramnose apresentaram tendência ao acúmulo na linhagem MT 1.1 em pericarpo de frutos maduros (60 DAA).

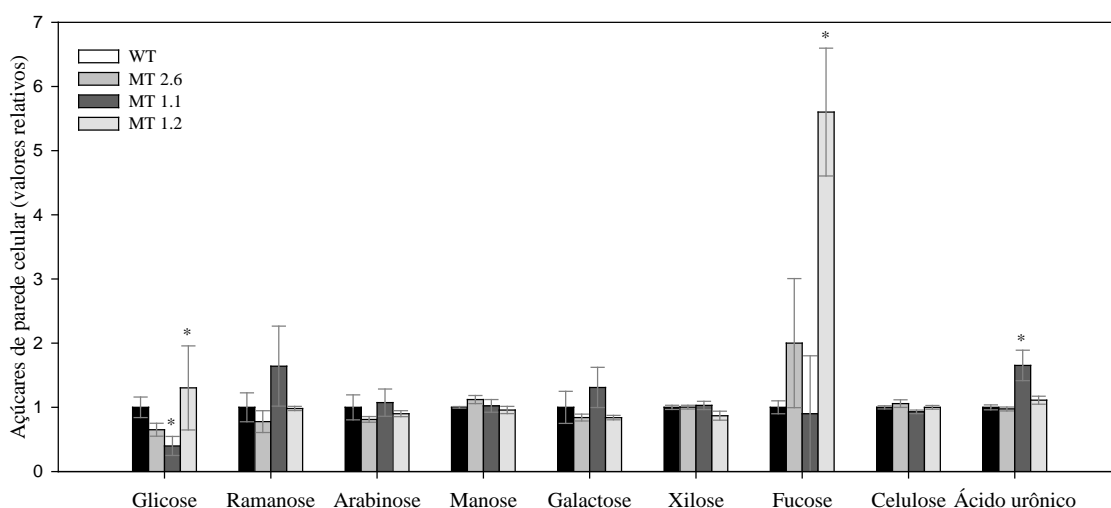


Figura 12. Açúcares neutros, celulose e ácido urônico de paredes celulares em pericarpo de frutos de 60 dias após a antese de plantas-controle (WT) e progênie transgênica T₂ silenciadas de tomateiros 'Moneymaker' quantificados via GC-MS. Asterisco indica diferença estatística pelo Teste-t ($p < 0,05$) em comparação com as plantas-controle (WT). Barras indicam erro padrão ($n = 3$) Os valores absolutos encontram-se nos Dados Suplementares.

3.4 DISCUSSÃO

Em frutos e sementes de linhagens silenciadas para *MIPSI*, os metabólitos primários em sementes e pericarpo e metabólitos de parede em pericarpo apresentaram modificação em sua abundância. Essa alteração ocorreu não somente nos metabólitos com estreita relação com metabolismo de inositol, mas verificou uma coordenação de alteração em distintos metabólitos, influenciados pelo que podemos inferir com a redução/modificação da atividade metabólica nas plantas silenciadas.

Anterior a este trabalho, Carrari *et al.* (2006) analisaram o perfil metabólico durante o desenvolvimento de frutos de tomateiro e correlacionaram a interação entre os metabólitos. Esse estudo apresentou 2.527 correlações significativas, dentre elas 614 positivas e 149 negativas. O *mio*-inositol e os *mio*-inositol polifosfato, foco de estudo desse trabalho com o silenciamento da *MIPS*, foi o quarto metabólito mais correlacionado, apresentando 25 correlações. Ele se correlacionou negativamente com todos os monossacarídeos (com exceção da arabinose) e positivamente com o dissacarídeo sacarose. Os demais metabólitos com maior número de correlações em pericarpo de tomate durante o desenvolvimento do fruto foram o ácido linoleico, glicerol-1-P, α -cetogluturato, GABA, glicose-6-P, quinato e frutose-6-P; desses, a maioria é intimamente ligado ao metabolismo de inositol. A correlação entre *mio*-inositol fosfato e sacarose foi anteriormente observada em uma população de introgressão em tomateiros (Schauer *et al.*, 2006) e durante análise de perfil metabólico em período diurno em *Arabidopsis* (Morgenthal *et al.*, 2005).

Quanto à abundância dos metabólitos em plantas de tomate com diferentes níveis de silenciamento de *MIPSI*, comparada aos níveis encontrados nas plantas-controle, os aminoácidos apresentaram decréscimo em sua abundância em sementes nas idades de 10, 50 e 60 DAA e em frutos nas idades de 10, 25 e 50 DAA quando comparado aos níveis da WT.

Os níveis de aminoácidos em frutos de plantas silenciadas na idade de 60 DAA, que representa a fase madura, apresentou acúmulo. Em pericarpos maduros é relatada a alta atividade da isocitato desidrogenase (ICDH) (Gallardo *et al.*, 1995), o que está vinculado ao fornecimento de 2-oxogluturato para a biossíntese de aminoácidos e assimilação de amônia (Chen e Gadai, 1990; Galvez *et al.*, 1999), os aminoácidos atuam como substratos alternativos da via respiratória quando o abastecimento de açúcar é

baixo e durante as fases posteriores do desenvolvimento do fruto, no qual a demanda de carbono é atendida exclusivamente por folhas-fonte das plantas.

O metabolismo de parede celular também pode proporcionar o aumento dos níveis de aminoácidos em pericarpos maduros devido à degradação proteica. Durante o processo de amadurecimento a atividade de enzimas, como proteases, associadas a parede celular, apresentam picos de atividade (Seymour *et al.*, 2013). Esse acréscimo comparado a WT pode sugerir rápida despolimerização da parede celular em plantas silenciadas apresentando redução em firmeza, resistência a patógenos e na vida pós-colheita dos frutos.

Apesar da modificação no conteúdo de aminoácidos em frutos maduros, verifica-se uma fina regulação nas demais idades avaliadas quando comparado os níveis entre sementes e pericarpo de frutos, ambos apresentando reduções. Toubianan *et al.* (2012) estudaram 76 linhas de introgressão em tomateiros e compararam os dados de metabólitos de sementes com os de pericarpo. Os metabólitos apresentaram estreita interdependência de processos metabólicos entre sementes e frutos.

Os aminoácidos em sementes mostram um papel central, mantendo interações com outras categorias de metabólitos, principalmente açúcares e ácidos orgânicos. Toubianan *et al.* (2012) apresentaram a correlação com uma extensa e estreita regulação do metabolismo da semente com metabolismo no fruto, com papel central apresentado pelos aminoácidos na rede metabólica de sementes.

A abundância dos ácidos orgânicos fosfatados em plantas *MIPS* silenciadas comparadas a WT também apresentou redução na abundância. O fosforato, o glicerato, o quinato e o benzoato acompanharam o comportamento de redução apresentado pelos aminoácidos, refletindo um evento coordenado do perfil metabólico em pericarpo e sementes. De maneira similar, nesse estudo os intermediários do ciclo TCA apresentaram redução significativa nas linhagens silenciadas, essa redução foi encontrada nas linhagens e metabólitos onde houve redução em aminoácidos e ácidos orgânicos.

A coordenação do metabolismo durante o desenvolvimento é visto em sementes de 25 DAA, quando os aminoácidos apresentam tendência ao acúmulo ou acúmulo significativo na abundância, os intermediários do ciclo TCA respondem de maneira similar, com acúmulo na abundância. Este padrão de acúmulo aos 25 dias após a antese é explicado pelo pico climatérico de maturação. Nesse momento ocorre aumento da

respiração o que justifica o aumento dos conteúdos de intermediários do TCA e aminoácidos (Oms-Oliu *et al.*, 2011)

Em 60 DAA o fruto se encontra em fase madura e o padrão de abundância de aminoácidos é modificado, havendo grande acúmulo sem que haja o mesmo comportamento nos intermediários fosfatados e intermediários do ciclo TCA, que se apresentam reduzidos. Essas alterações são reflexo das mudanças na atividade das enzimas do ciclo de TCA, que diminuem durante a transição cloroplasto para cromoplasto em frutos de tomate (Jeffery *et al.*, 1986). Estudos anteriores relatam alterações do conteúdo dos principais ácidos citrato e malato (Davies, 1965, 1966; Stevens, 1972). No entanto, é importante salientar que as alterações no conteúdo de ácidos orgânicos são variáveis entre as cultivares americanas e européias de tomateiros. Independente da cultivar, os conteúdos de citrato e isocitrato podem se manter altos até em estádios avançados de amadurecimento, juntamente com a alta atividade de NADP-ICDH em pericarpos maduros (Gallardo *et al.*, 1995), o que resulta no acúmulo de aminoácidos, como salientado anteriormente.

Os açúcares por sua vez foram mais respondentes à interação com os conteúdos de inositol ou expressão de *MIPSI*, onde a redução da conversão de glicose-6-P para *mio*-inositol resultaria no acúmulo dos principais mono e dissacarídeos, como glicose, frutose e sacarose. Esse comportamento foi verificado em sementes de 10 e 25 DAA, porém esse padrão se inverte em sementes de 50 e 60 DAA, apresentando uma forte redução de glicose e sacarose, e forte acúmulo de frutose em plantas silenciadas quando comparado com a WT.

Em frutos, verificou-se padrão similar durante os estádios 10 e 25 DAA em que glicose e sacarose acumulam, modificando seu comportamento aos 50 e 60 DAA, onde passam a apresentar abundância reduzida em comparação com as plantas-controle. Com o início do amadurecimento, o amido armazenado nos plastídeos são convertidos em açúcares tais como glicose e frutose, que se acumulam em níveis superiores aos necessários para respiração (Tucker, 1993). Como resultado, tomates em fase de maturação aumentaram os níveis de frutose, glicose enquanto que os níveis de sacarose diminuem progressivamente durante a maturação e amadurecimento de frutas (Oms-Oliu *et al.*, 2011).

A avaliação dos açúcares álcool apresentaram acúmulo em todas as idades e em pericarpos e sementes, com exceção do *mio*-inositol-1-P que apresentou redução de conteúdo nas idades que o metabólito foi identificado. Gomez-Merino *et al.* (2005)

destacaram a importância e o envolvimento dos *mio*-inositol fosfato em diversos processos, abrangendo a transdução de sinais, a osmoproteção, o metabolismo de auxina, ressaltando a essencialidade de uma fina regulação. Schauer *et al.* (2006) sugerem que esta regulação acompanha os níveis momentâneos de sacarose e, dessa forma, o *mio*-inositol e os seus derivados se apresentariam como moléculas com potencial regulação do desenvolvimento de frutos. No estudo da população em introgressão Zamir de tomates; o *mio*-inositol foi um dos poucos metabólitos fortemente ligados às características associadas à linhagem estudada (Schauer *et al.*, 2006).

A parede celular tem seu metabolismo desenvolvido e regulado durante o amadurecimento de frutos (Hadfield e Bennett, 1998; Rose *et al.*, 2004). No presente estudo os monossacarídeos de parede celular xilose, glicose, ramnose, arabinose, galactose, fucose e manose em frutos de 60 DAA. O açúcar com maior abundância foi a glicose, apresentando acúmulo no nível mais silenciado. Esse acúmulo pode ser explicado pela redução da conversão da glicose-6-P a *mio*-inositol.

Os monossacarídeos arabinose, galactose e ramnose são liberados pela degradação de derivados de pectinas arabinanas e galactanas durante o metabolismo de parede celular, desenvolvido no processo de maturação (Sakurai e Nevins, 1993) o que pode ter mascarado o pool de monossacarídeos de parede avaliados, assim, a alteração ou não desse conteúdo podem resultar não somente ao silenciamento, mas também ao metabolismo estimulado pela idade do fruto em parede celulares.

Polissacarídeos da parede celular são sintetizados pelas glicosiltransferases ligadas à membrana celular utilizando nucleotídeos de açúcar presentes no citosol, tais como uridina-5 difosfoglicose (UDP- Glc), guanosina difosfomanose (GDP-Man) e UDP-ácido glucurônico (UDP-GlcA) (Sharples e Fry, 2007). UDP-GlcA podem ser produzidas de duas maneiras: a partir de UDP-Glicose (UDP-Glc desidrogenase), ou a partir de inositol, através do *mio*-inositol oxigenase (*MIOX*) (Lorence *et al.*, 2004). A via *MIOX* converte inositol ao ácido glucurônico o qual pode ser ainda fosforilado para gerar ácido glucurônico-1-fosfato, que é então convertido em UDP-GlcA fornecendo nucleotídeos de açúcares necessários para a síntese da parede celular em uma reação termodinamicamente irreversível (Endres e Tenhaken, 2009).

Estudos com a arábida nocauteada para *MIOX1* e *MIOX2* apresentaram drástica redução na incorporação de ³H-inositol em polímeros de parede celular, enquanto a superexpressão de *MIOX4* resultou no aumento da incorporação de açúcares de parede de origem da *MIOX4* o que indica a utilização do ácido glucurônico de

origem da *MIOX* gera polissacarídeos da parede celular. (Endres e Tenhaken, 2009). Porém, esta não é a única via de nucleotídeos de açúcar para parede celular. A UDP-Glc através da ação da UDP-glicose desidrogenase gera o UDP-GlcA, este por sua vez produz os resíduos de galacturonato, xilose arabinose, apiose na parede celular. Essa via foi evidenciada através de galactose e frutose marcados, considerada como via principal, e a via de glicose-6-P através de inositol como alternativa (Sharples e Fry, 2007).

A celulose avaliada em extratos de parede celular de frutos contendo 60 DAA não apresentou diferença entre as plantas-controle e os níveis de silenciamento. Essa resposta já era esperada uma vez que os monossacarídeos de parede celular foram pouco interferidos pelo silenciamento da *MIPS*. Os ácidos urônicos apresentaram acúmulo em paredes celulares de frutos das linhagens silenciadas.

Em plantas, a celulose é incorporada numa matriz solúvel de polissacarídeos e glicoproteínas da parede celular. No fruto do tomate, a pectina é a mais abundante macromolécula dentro dessa matriz, tanto na lamela média quanto na parede celular primária, e compõe 30-35% do peso seco da parede celular (Kaczowski, 2003; Mohnen, 2008). Pectina é um grupo altamente complexo de polissacarídeos que podem conter até 17 monossacarídeos diferentes, os quais são ricos em ácido galacturônico. Quatro principais tipos de polissacarídeos pécnicos foram descritos: homogalacturonano (HGA), ramnogalacturonano I (*RG-I*), ramnogalacturonano II (*RG-II*) e xilogalacturonan (*XGA*) (Kaczowski, 2003). Algumas enzimas degradantes de pectina apresentam fortes correlações com açúcar-fosfato, sugerindo que os componentes degradados da parede celular retornam ao interior da célula para alimentar o metabolismo de carbono (Carrari *et al.*, 2006).

3.5 CONCLUSÕES

O silenciamento parcial da enzima MIPS através da transformação genética do tipo *intron-hairpin-RNA* com controle do promotor *CaMV 35S* é capaz de proporcionar alteração no metabolismo de frutos e sementes. Assim, ao avaliarem-se seis diferentes níveis de expressão desse gene em quatro idades e estádios de desenvolvimento de frutos foi possível identificar alterações em uma série de metabólitos primários e de parede celular.

Neste contexto, o silenciamento parcial da *mio*-inositol fosfato sintase altera principalmente o conteúdo de aminoácidos e açúcares em todas as quatro idades avaliadas (10, 15, 50 e 60 DAA) tanto em pericarpos de frutos quanto em sementes. A intensidade da variação do conteúdo de metabólitos é proporcional a proximidade desses com o metabolismo de inositol, nível de silenciamento e também se associam as variações metabólicas normalmente observadas no que diz respeito à idade e estágio de desenvolvimento dos frutos e sementes.

3.6 REFERÊNCIAS

- Abid G, Silue S, Muhovski Y, Jacquemin JM, Toussaint A, Baudoin JP. 2009. Role of myo-inositol phosphate synthase and sucrose synthase genes in plant seed development. *Gene* 439:1–10
- Abreu EFM, Aragão FJL. 2007. Isolation and characterization of a myo-inositol-1-phosphate synthase gene from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressed during seed development and environmental stress. *Annals of Botany* 99:285–292
- Abu-Abied M, Holland D. 1994. The gene *c-inol* from *Citrus paradise* is highly homologous to *tur1* and *inol* from yeast and *Spirodela* encoding for myo-inositol phosphate synthase. *Plant Physiology* 106:1689.
- Alfenas-Zerbini P, Maia IG, Fávoro RD, Cascardo JCM, Brommonschenkel SH, Zerbini FM. 2009. Genome-wide analysis of differentially expressed genes during the early stages of tomato infection by a Potyvirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:352–361.
- Ali N, Paul S, Gayen D, Sarkar SN, Datta SK, Datta K. 2013. RNAi mediated down regulation of myo-inositol-3-phosphate synthase to generate low phytate rice. *Rice* 6-12.
- Bapat VA, Trivedi PK, Ghosh A, Sane VA, Ganapathi TR, Nath P. 2010. Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology Advances* 28:94–107.
- Barka EA, Kalantari S, Makhlof J, Arul J. 2000. Impact of UV-C irradiation on the cell wall-degrading enzymes during ripening of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:667–671.
- Bartley GE, Scolnik PA, Giuliano G. 1994. Molecular biology of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45:287–301
- Bilyeu KD, Zeng P, Coello P, Zhang ZJ, Krishnan HB, Bailey A, Beuselinck PR, Polacco JC. 2008. Quantitative Conversion of Phytate to Inorganic Phosphorus in Soybean Seeds Expressing a Bacterial Phytase. *Plant Physiology* 146:468–477.
- Bolmgren K, Eriksson O. 2005. Fleshy fruits—origins, niche shifts, and diversification. *Oikos* 109:255–72
- Brady CJ. 1987. Fruit ripening. *Annual Review of Plant Physiology* 38:155–178.
- Brearley CA, Parmar PN, Hanke DE. 1983. Metabolic evidence for PtdIns(4,5)P₂-directed phospholipase C in permeabilized plant protoplasts. *Biochemistry Journal* 324:123–131.

- Busi M V, Bustamante C, D'Angelo C, Hidalgo-Cuevas M, Boggio SB, Valle EM. 2003. MADS-box genes expressed during tomato seed and fruit development. *Plant Molecular Biology*. 52:801–815.
- Campion B, Sparvoli F, Doria E, Tagliabue G, Galasso I, Fileppi M, Bollini R, Nielsen E. 2009. Isolation and characterisation of an lpa (low phytic acid) mutant in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 18:1211–1221.
- Carpita NCC, McCann MC. 2008. Maize and sorghum: genetic resources for bioenergy grasses. *Trends in Plant Science* 13:415–420.
- Carrari F, Baxter C, Usadel B, Urbanczyk-Wochniak E, Zanon M, Nunes-Nesi A, Nikiforova V, Centeno D, Ratzka A, Pauly M, Sweetlove LJ, Fernie AR. 2006. Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior. *Plant Physiology* 142:1380–1396
- Carrari F, Baxter C, Usadel B, Urbanczyk-Wochniak E, Zanon MI, Nunes-Nesi A. 2006. Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior. *Plant Physiology*. 142:1380–1396.
- Carrari F, Fernie AR, Iusem ND. 2004. Heard it through the grapevine? ABA and sugar cross-talk: the ASR story. *Trends in Plant Science* 9:57–59
- Carrari F, Fernie AR. 2006. Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany* 57:1883–1897
- Carroll A, Somerville C. 2009. Cellulosic biofuels. *Annual Review of Plant Biology* 60:165–182.
- Chapman NH, Bonnet J, Grivet L, Lynn J, Graham N, et al. 2012. High resolution mapping of a fruit firmness-related QTL in tomato reveals epistatic interactions associated with a complex combinatorial locus. *Plant Physiology* 159:1644–57
- Chen RD, Gadal P. 1990. Do the mitochondria provide the 2-oxoglutarate needed for glutamate synthesis in higher plant chloroplasts? *Plant Physiology & Biochemistry* 28:141–145
- Chiera JM, Finer JJ, Grabau EA. 2004. Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of *Glycine max* to improve phosphorus availability. *Plant Molecular Biology* 56:895–904
- Chun JA, Jin UH, Lee JW, Yi YB, Hyung NI, Kang MH. 2003. Isolation and characterization of a myo-inositol 1-phosphate synthase cDNA from developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds: functional and differential expression, and salt-induced transcription during germination. *Planta* 216:874–880.

Cowan AK, Cripps RF, Richings EW, Taylor N. 2001. Fruit size: towards an understanding of the metabolic control of fruit growth using avocado as a model system. *Plant Physiology* 111:127–136.

Cowan AK, Cripps RF, Richings EW, Taylor N. 2001. Fruit size: towards an understanding of the metabolic control of fruit growth using avocado as a model system. *Plant Physiology* 111:127–136.

CRUZ CD. 2013. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy* 35:271-276

Dastidar K, Maitra S, Goswami L, Roy D, Das KP, Majumder AL. 2006. An Insight into the molecular basis of salt tolerance of l-myo-inositol 1-P synthase (PcINO1) from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice. *Plant Physiology* 140:1279–1296.

Desbrosses GG, Kopka J, Udvardi MK. 2005. *Lotus japonicus* metabolic profiling. Development of gas chromatography-mass spectrometry resources for the study of plant–microbe interactions. *Plant Physiology* 137:1302– 1318

Dische Z. 1962. General color reactions. *Methods in Carbohydrate Chemistry* 1:478–492

Donahue JL, Alford SR, Torabinejad J, Kerwin RE, Nourbakhsh A, Ray WK, Hernick M, Huang XY, Lyons BM, Hein PP. 2010. The Arabidopsis thaliana Myo-Inositol 1-Phosphate Synthase1 gene is required for myo-inositol synthesis and suppression of cell death. *Plant Cell* 22:888–903.

Doyle JJ, Doyle JL, Hortorium LHB. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.

Endres S, Tenhaken R. 2009. Myoinositol oxygenase controls the level of myo-inositol in Arabidopsis, but does not increase ascorbic acid. *Plant Physiology* 149:1042–1049.

Fatima T, Rivera-Domínguez M, Troncoso-Rojas R, Tiznado-Hernández ME, Handa A. K, Mattoo AK. 2008. Tomato. In Kole C & Hall TC. (Eds.), *Compendium of transgenic crop plants: Transgenic vegetable crops*. Oxford, UK: Blackwell Publishing. 46 p.

Fernandes D. 2009. Morfogênese *in vitro* em tomateiro e berinjela e silenciamento gênico da sintase do mio-inositol-fosfato por rnai em tomateiro. Dissertação em Fisiologia Vegetal de Magister Scientiae. Universidade Federal de Viçosa. 89 p.

Fernie AR, Tadmor Y, Zamir D. 2006. Natural genetic variation for improving crop quality. *Current Opinion in Plant Biology* 9:196–202

Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, Willmitzer L. 2004. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5:763–769

Fernie AR, Willmitzer L. 2001. Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiology* 127:1459–1465

Fiehn O. 2002. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48:155-171.

Filisetti-Cozzi TMCC, Carpita NC. 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* 197:157-162.

Gallardo F, Galvez S, Gadal P, Canovas FM. 1995. Changes in NADP1-linked isocitrate dehydrogenase during tomato fruit ripening. Characterization of the predominant cytosolic enzyme from green and ripe pericarp. *Planta* 196:148–154

Gálvez S, Lancien M, Hodges M. 1999. Are isocitrate dehydrogenases and 2-oxoglutarate involved in the regulation of glutamate synthesis? *Trends in Plant Science* 4:484–490

Gibon Y, Bläsing OE, Hannemann J, Carillo P, Hoehne M, Hendriks JHM, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M. 2004. A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell* 16:3304–3325

Gibon Y, Usadel B, Blaesing OE, Kamlage B, Hoehne M, Trethewey R, Stitt M. 2006. Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in Arabidopsis rosettes. *Genome Biology* 7:76.

Giovannoni JJ. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16:170–180.

Giovannoni JJ. 2007. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology* 10:283–289.

Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang RL, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* 296:92–100

Gomez-Merino FC, Arana-Ceballos FA, Trejo-Tellez LI, Skirycz A, Brearley CA, Mueller-Roeber B. 2005. Arabidopsis AtDGK7, the smallest member of plant diacylglycerol kinases (DGKs), displays unique biochemical features and saturates at low substrate concentration: The DGK inhibitor R59022 differentially affects AtDGK2 and AtDGK7 activity in vitro and alters plant growth and development. *Journal of Biological Chemistry* 280:34888–34899

Goyoaga C, Burbano C, Cuadrado C, Romero C, Guillamón E, Varela A, Pedrosa MM, Muzquiz M. 2011. Content and distribution of protein, sugars and inositol phosphates during the germination and seedling growth of two cultivars of *Vicia faba*. *Journal of Food Composition and Analysis* 24:391–397.

Hadfield KA, Bennett AB. 1998. Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiology*. 117:337–343

- Hara K, Yagi M, Koizumi N, Kusano T, Sano H. 2000. Screening of wound-responsive genes identifies an immediate-early expressed gene encoding a highly charged protein in mechanically wounded tobacco plants. *Plant and Cell Physiology* 41:684–691.
- Hay J, Schwender J. 2011. Computational analysis of storage synthesis in developing *Brassica napus* L. (oilseed rape) embryos: flux variability analysis in relation to C-13 metabolic flux analysis. *Plant Journal* 67:513–525
- Heaton EA, Flavell RB, Mascia PN, Thomas SR, Doehleman FG, Long SP. 2008. Herbaceous energy crop development: recent progress and future prospects. *Current Opinion in Plant Biotechnology* 19:202–209.
- Hegeman CE, Good LL, Grabau EA. 2001. Expression of D-myo-inositol-3-phosphate synthase in soybean. Implications for phytic acid biosynthesis. *Plant Physiology* 125:1941–1948.
- Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The Water-Cultured Method for Growing without Soil. Circular n° 347. *California Agricultural Experiment Station*. 32 p.
- Ishitani M, Majumder AL, Bornhouser A, Michalowski CB, Jensen RG, Bohnert HJ. 1996. Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress. *Plant Journal* 9:537–548.
- Ishizaki K. 2005. The critical role of Arabidopsis electrontransfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductase during darkinduced starvation. *Plant Cell* 17:2587–2600
- Jeffery D, Goodenough PW, Weitzman PDJ. 1986. Enzyme activities in mitochondria isolated from ripening tomato fruit. *Planta* 168:390–394
- Johnson MD. 1994. The Arabidopsis thaliana myo-inositol-1-phosphate synthase (EC 5.5.1.4). *Plant Physiology* 105:1023–1024.
- Kaczkowski J. 2003. Structure, function and metabolism of plant cell wall. *Acta Physiologiae Plantarum* 25:287-305
- Kanani H, Dutta B, Klapa MI. 2010. Individual vs. combinatorial effect of elevated CO₂ conditions and salinity stress on Arabidopsis thaliana liquid cultures: comparing the early molecular response using time-series transcriptomic and metabolomic analyses. *BioMed Central Systems Biology* 4:177-191
- Keller R, Brearley CA, Trethewey RN, Muller-Rober B. 1998. Reduced inositol content and altered morphology in transgenic potato plants inhibited for 1D-myo-inositol 3-phosphate synthase. *Plant Journal* 16:403–410
- Kersting MC, Boyette M, Massey J, Ryals PE. 2003. Identification of the inositol isomers present in Tetrahymena, *Journal of Eukaryotic Microbiology* 50:164–168
- Kopeliovitch E, Mizrahi Y, Rabinowitch HD, Kedar N. 1980. Physiology of the tomato mutant alcobaca. *Plant Physiology* 48:307–311.

- Kose F, Weckwerth W, Linke T, Fiehn O. 2001. Visualizing plant metabolomic correlation networks using clique–metabolite matrices. *Bioinformatics* 17:1198–1208
- Larson SR, Raboy V. 1999. Linkage mapping of maize and barley myo-inositol 1-phosphate synthase DNA sequences: correspondence with a low phytic acid mutation. *Theoretical and Applied Genetics* 99:27–36.
- Larson SR, Rutger JN, Young KA, Raboy V. 2000. Isolation and genetic mapping of a non-lethal rice (*Oryza sativa* L.) low phytic acid 1 mutation. *Crop Science* 40:1397–1405.
- Larson SR, Young KA, Cook A, Blake TK, Raboy V. 1998. Linkage mapping of two mutations that reduce phytic acid content of barley grain. *Theoretical and Applied Genetics*. 97:141–146 616.
- Latrasse D, Jégou T, Meng P, Mazubert C, Hudik E, Delarue M, Charon C, Crespi M, Hirt H, Raynaud C, Bergounioux C, Benhamed M. 2013. Dual function of MIPS1 as a metabolic enzyme and transcriptional regulator. *Nucleic Acids Research* 41:2907–2917.
- Lelièvre JM, Latché A, Jones B, Mondher B, Pech JC. 1997. Ethylene and fruit ripening. *Plant Physiology* 101:727–739
- Lincoln J, Fischer R. 1988. Regulation of gene expression by ethylene in wild-type and rin tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *Plant Physiology* 88:370–374
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* 1:387–396.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25:402–408.
- Loewus FA, Loewus MW. 1983. myo-Inositol : its biosynthesis and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* 34:137–161.
- Loewus FA, Murthy PPN. 2000. myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Science* 150:1–19.
- Lopez-Casado G, Urbanowicz BR, Damasceno CMB, Rose JKC. 2008. Plant glycosyl hydrolases and biofuels: a natural marriage. *Current Opinion in Plant Biology* 11:329–337.
- Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL. 2004. Myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology* 134:1200–1205.
- Lou Y, Gou JY, Xue HW. 2007. PIP5K9, an Arabidopsis phosphatidylinositol monophosphate kinase, interacts with a cytosolic invertase to negatively regulate sugar-mediated root growth. *Plant Cell* 19:163–181.
- Lüdemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J. 2008. TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics*. 24:732–737.

- Ma H, Lou Y, Lin WH, Xue HW. 2006. MORN motifs in plant PIPKs are involved in the regulation of subcellular localization and phospholipid binding. *Cell* 16:466–478.
- Majee M, Maitra S, Dastidar KG, Pattnaik S, Chatterjee A, Hait NC. 2004. A novel salt-tolerant L-myo-inositol-1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice. *Journal of Biological Chemistry* 279:28539–28552.
- Majumder AL, Biswas BB. 2006. *Biology of Inositols and Phosphoinositides*. Springer, Netherlands (Ed)
- Majumder AL, Johnson MD, Henry SA. 1997. 1L-myoInositol-1-phosphate synthase, *Biochimica et Biophysica Acta* 1348:245–25.
- Manning R, Tor K, Poole M, Hong M, Thompson Y, King A. 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SPB-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics* 38:949–952.
- Martínez-Noël G, Tognetti J, Nagaraj V, Wiemken A, Pontis H. 2006. Calcium is essential for fructan synthesis induction mediated by sucrose in wheat. *Planta* 225:183–191.
- Mohnen D, Somerville C. 2007. The *Arabidopsis* irregular xylem8 mutant is deficient in glucuronoxylan and homogalacturonan, which are essential for secondary cell wall integrity. *PlantCell* 19:237–255.
- Morgenthal K, Wienkoop S, Scholz M, Selbig J, Weckwerth W. 2005. Correlative GC-TOF-MS based metabolite profiling and LC-MS based-protein profiling reveal time-related systemic regulation of metabolite-protein networks and improve pattern recognition for multiple biomarker selection. *Metabolomics* 1:109–121
- Morré DJ, Boss WF, Loewus FA. 1990. *Inositol Metabolism in Plants*. (Eds.) Wiley-Liss, New York, p 393.
- Mounet F, Moing A, Garcia V, Petit J, Maucourt M, Deborde C. 2009. Gene and metabolite regulatory network analysis of early developing fruit tissues highlights new candidate genes for the control of tomato fruit composition and development. *Plant Physiology* 149:1505–1528.
- Mueller AL, Solow TH, Taylor N, Skwarecki B, Buels R, Bins J, Lin C, WrightMH, Ahrens R, WangY, Herbst EV, Keyder ER, Menda N, Zamir D, Tanksley SD. 2005. The SOL Genomics Network (SGN): a comparative resource for Solanaceous biology and beyond. *Plant Physiology* 138:1310–1317
- Murphy AM, Otto B, Brearley CA, Carr JP, Hanke DE. 2008. A role for inositol hexakisphosphate in the maintenance of basal resistance to plant pathogens. *Plant Journal* 56:638–652.
- Mutschler MA. 1984. Ripening and storage characteristics of the ‘alcobaça’ ripening mutant in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 109:504–507.

- Nunes A, Vianna G, Cuneo F, Amaya-Farfán J, Capdeville G, Rech E, Aragão F. 2006. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPSI*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta* 224:125-132.
- Okada M, Ye K. 2009. Nuclear phosphoinositide signaling regulates messenger RNA export. *RNA Biology* 6:12-16.
- Oms-Oliu G, Hertoga MLATM, Van de Poela B, Ampofo-Asiamaa J, Geeraerda AH, Nicolaia BM. 2011. Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening, and postharvest shelf-life. *Postharvest Biology and Technology* 62:7-16.
- Pauly M, Keegstra K. 2008. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant Journal* 54:559-568.
- Price J, Laxmi A, Martin SK, Jang JC. 2004. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. *Plant Cell* 16:2128-2150.
- Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).
- Raboy V. 2000. Genetics and breeding of seed phosphorus and phytic acid. *Plant Physiology* 158:489-494
- Raboy V. 2006. Seed phosphorus and the development of low-phytate crops, in: Turner BL, Richardson AE, Mullaney EJ, (Eds.) *Inositol Phosphates: Linking Agriculture and Environment*, CAB International, Oxfordshire 111-132.
- Riedelsheimer, C. Lisek J, Czedik-Eysenberg A, Sulpice R, Flis A, Grieder C, Altmann T, Stitt M, Willmitzer L, Melchinger AE. 2012. Genome-wide association mapping of leaf metabolic profiles for dissecting complex traits in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109:8872-8877
- Ritsema T, Brodmann D, Diks SH, Bos CL, Nagaraj V, Pieterse CMJ, Boller T, Wiemken A, Peppelenbosch MP. 2009. Are small GTPases signal hubs in sugar-mediated induction of fructan biosynthesis? *PLoS One* 4:6605.
- Roessner U, Luedemann A, Brust D, Fiehn O, Linke T, Willmitzer L, Fernie AR. 2001. Metabolic profiling and phenotyping of genetically and environmentally modified systems. *Plant Cell* 13:131-142
- Roessner-Tunali U, Hegemann B, Lytovchenko A, Carrari F, Bruedigam C, Granot D, Fernie AR. 2003. Metabolic proofing of transgenic tomato plants overexpressing hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. *Plant Physiology* 133:84-99.
- Rose JKC, Bashir S, Giovannoni JJ, Jahn MM, Saravanan RS. 2004. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant Journal* 39:715-733.

- Sakurai N, Nevins DJ. 1993. Changes in physical properties and cell wall polysaccharides of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pericarp tissues. *Plant Physiology* 89:681–686
- Sasaki K, Nagahashi G, Gretz MR, Taylor IEP. 1989. Use of Per-C-deuterated myoinositol for study of cell wall synthesis in germinating beans. *Plant Physiology* 90:686–689.
- Sato T, Atomi H. 2011. Novel metabolic pathways in Archaea. Ecology and industrial microbiology / Special section: *Archaea* 14:307–314
- Schauer N, Zamir D, Fernie AR. 2005. Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. *Journal of Experimental Botany* 56:297–307
- Schauer N, Semel Y, Roessner U, Gur A, Balbo I, Carrari F, Pleban T, Perez-Melis A, Bruedigam C, Kopka J. 2006. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of intraspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology* 24:447–454
- Schauer, N. Semel Y, Balbo I, Steinfath M, Repsilber D, Selbig J, Pleban T, Zamir D, Fernie AR. 2008. Mode of inheritance of primary metabolic traits in tomato. *Plant Cell* 20:509–523
- Scheible WR, Pauly M. 2004. Glucosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Current Opinion in Plant Biology* 7:285–295
- Sharples SC, Fry SC. 2007. Radioisotope ratios discriminate between competing pathways of cell wall polysaccharide and RNA biosynthesis in living plant cells. *Plant Journal* 52:252–262.
- Sheveleva E, Chmara W, Bohnert HJ, Jensen RG. 1997. Increased salt and drought tolerance by d-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiology* 115:1211–1219.
- Shi J, Wang H, Schellin K, Li B, Faller M, Stoop JM, Meeley RB, Ertl DS, Ranch JP, Glassman K. 2007. Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. *Nature Biotechnology* 25:930–937
- Shi J, Wang H, Wu Y, Hazebroek J, Meeley RB, Ertl DS. 2003. The maize low-phytic acid mutant *lpa2* is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gene. *Plant Physiology* 131:507–515
- Smart CC, Fleming AJ. 1993. A plant gene with homology to D-myo-inositol-3-phosphate synthase is rapidly and spatially upregulated during an abscisic-acid-induced morphogenic response in *Spirodela polyrrhiza*. *Plant Journal* 4:279–293.
- Stevens MA. 1972. Relationships between components contributing to quality variation among tomato lines. *American Society Horticultural and Science* 97:70–76

- Stevenson JM, Perera IY, Heilmann I, Persson S, Boss WF. 2000. Inositol signaling and plant growth. *Trends. Plant Science* 5:252–258.
- Stevenson-Paulik J, Bastidas RJ, Chiou ST, Frye RA, York JD. 2005. Generation of phytate-free seeds in Arabidopsis through disruption of inositol polyphosphate kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102:12612–12617.
- Suzuki, Y. Fujimori T, Kanno K, Sasaki A, Ohashi Y, Makino A. 2012. Metabolome analysis of photosynthesis and the related primary metabolites in the leaves of transgenic rice plants with increased or decreased Rubisco content. *Plant Cell Environment* 35:1369–1379
- Ter Kuile BH, Westerhoff HV. 2001. Transcriptome meets metabolome: hierarchical and metabolic regulation of the glycolytic pathway. *Federation of European Biochemical Societies* 500:169–171.
- Thole JM, Nielsen E. 2008. Phosphoinositides in plants: novel functions in membrane trafficking. *Current Opinion in Plant Biology* 11:620-631.
- Tigchelaar EC, McGlasson WB, Buescher RW. 1978. Genetic regulation of tomato fruit ripening. *Horticultural Science* 13:508–513.
- Tigchelaar EC, McGlasson WB, Buesches RW. 1978. Genetic regulation of tomato fruit ripening. *Horticultural Science* 13:508–513.
- Tomato Genome Consort. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruits. fruit evolution. *Nature* 485:635–41.
- Toubiana, D. Semel Y, Tohge T, Beleggia R, Cattivelli L, Rosental L, Nikoloski Z, Zamir D, Fernie AR, Fait A. 2012. Metabolic profiling of a mapping population exposes new insights in the regulation of seed metabolism and seed, fruit, and plant relations. *PLoS Genetics* 8: e1002612.
- Tucker GA. 1993. Introduction: respiration and energy. In: Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA. (Eds.). *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman & Hall, London, 3–9 p.
- Updegraff DM. 1969. Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Analytical Biochemistry* 32:420–424
- Urbanczyk-Wochniak E, Baxter C, Kolbe A, Kopka J, Sweetlove LJ, Fernie AR. 2005. Profiling of diurnal patterns of metabolite and transcript abundance in potato (*Solanum tuberosum*) leaves. *Planta* 221:891–903
- Valluru R, Ende WV. 2011. Myo-inositol and beyond- emerging networks under stress. *Plant Science* 18:387–400
- Van de Poel B, Bulens I, Hertog MLATM, Van Gastel L, De Proft MP, Nicolai BM, Geeraerd AH. 2012. Model-based classification of tomato fruit development and ripening related to physiological maturity. *Postharvest Biology and Technology* 67:59–67.

- Weckwerth W. 2008. Integration of metabolomics and proteomics in molecular plant physiology – coping with the complexity by data-dimensionality reduction. *Plant Physiology* 132:176–189.
- Wilcox J, Premachandra G, Yound K, Raboy V. 2000. Isolation of high seed inorganic P, low-phytate soybean mutants. *Crop Science* 40:1601–1605
- Xiang L, Le Roy K, Bolouri-Moghaddam M, Vanhaecke M, Lammens W, Rolland F, Van den Ende W. 2011. Exploring the neutral invertase-oxidative stress defense connections in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 62:3849–3862.
- Xue H, Chen X, Li G. 2007. Involvement of phospholipid signaling in plant growth and hormone effects. *Current Opinion in Plant Biology* 10:483–489.
- Yakir E, Hilman D, Harir Y, Green RM. 2007. Regulation of output from the plant circadian clock. *Federation of European Biochemical Societies* 274:335–345
- Yoshida KT, Wada T, Koyama H, Mizobuchi-Fukuoka R, Naito S. 1999. Temporal and spatial patterns of accumulation of the transcript of myo-inositol-1-phosphate synthase and phytin-containing particles during seed development in rice. *Plant Physiology* 119:65–72.
- Yuan JS, Tiller KH, Al-Ahmad H, Stewart NR, Stewart CNJr. 2008. Plants to power: bioenergy to fuel the future. *Trends in Plant Science* 13:421–429.
- Zhang Z, Huber DJ, Rao J. 2010. Short-term hypoxic hypobarica transiently decreases internal ethylene levels and increases sensitivity of tomato fruit to subsequent 1-methylcyclopropene treatments. *Postharvest Biology and Technology* 56:131–137.

CAPITULO 4

Silenciamento da *mio*-inositol-fosfato sintase (*MIPS1*) incrementa o conteúdo de açúcares sem alterar o sistema enzimático antioxidante e componentes da parede celular

4.1 INTRODUÇÃO

O *mio*-inositol é produto da enzima *mio*-inositol fosfato sintase (*MIPSI*) (E.C.5.5.1.4) que catalisa a conversão irreversível de D-Glicose-6-P para 1-L-*mio*-inositol-1-P. Essa é a única via de biossíntese *de novo*, sendo encontrada em cianobactérias, algas, fungos e plantas e possui papel central no metabolismo celular (Loewus e Loewus, 1983; Morré *et al.*, 1990; Majumder 1997).

A sequência da enzima MIPS foi descrita em mais de 70 organismos diferentes; nestes, verificou-se que sequências codificadoras para MIPS são pertencentes a uma família multigênica, com alta similaridade entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos, apresentando o domínio catalítico conservado evolutivamente entre os filós (Abreu e Aragão 2007; Sato *et al.*, 2011).

Sequências codificadas de MIPS foram isoladas e caracterizadas de várias espécies vegetais, tais como: *Spirodela polyrrhiza* (Smart e Fleming, 1993), *Arabidopsis thaliana* (Johnson, 1994), *Citrus paradisi* (Abu-Abied e Holland, 1994), *Mesembryanthemum crystallinum* (Ishitani *et al.*, 1996), *Nicotiana tabacum* (Hara *et al.*, 2000), *Glycine max* (Hegeman *et al.*, 2001), *Hordeum vulgare* (Larson e Raboy, 1999), *Oryza sativa* (Yoshida, 1999), *Zea mays* (Larson e Raboy, 1999), *Porteresia coarctata* (Majee *et al.*, 2004), *Sesamum indicum* (Chun *et al.*, 2003) e *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Abreu e Aragão 2007). Até o momento MIPS não foi descrita e caracterizada experimentalmente em tomateiros.

Transcritos de MIPS de diferentes espécies têm sido encontrados em óvulos, grãos de pólen, sementes em desenvolvimento, folhas de plantas cultivadas em condições de campo (Abreu e Aragão 2007), flores, cotilédones em germinação, embriões somáticos (Hegeman *et al.*, 2001). Porém, até o presente momento, órgãos vegetativos e desenvolvimento de frutos carnosos em plantas com baixa expressão de MIPS não foram caracterizados em detalhes. Os esforços das pesquisas têm focado no conteúdo de moléculas alvo, como fitatos e oligossacarídeos em sementes, mas salienta-se a necessidade de estudos em órgãos vegetativos (Nunes *et al.*, 2006; Fernandes, 2009, Donahue *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2013).

Mutantes nulos da MIPS são letais, dessa forma as vias biossintéticas influenciadas pelo *mio*-inositol, produto da MIPS, necessitam de outras abordagens de estudo. O silenciamento de RNA, mediado via RNA de interferência possibilita a investigação de alterações na biossíntese e metabolismo de *mio*-inositol (Nunes *et al.*,

2006). No entanto, níveis mais elevados de silenciamento podem comprometer a homeostase e manutenção de processos fisiológicos e reprodutivos resultando em alterações não esperadas e desvantajosas nas plantas silenciadas (Keller *et al.*, 1998; Nunes *et al.*, 2006; Fernandes, 2009; Donahue *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2013).

O *mio*-inositol é um componente essencial na biossíntese de uma variedade de derivados que vão desde simples fosfatos de inositol até complexos produtos associados à membrana com funções celulares importantes (Dong *et al.*, 2013). Em plantas, o *mio*-inositol desempenha papel de destaque no metabolismo fornecendo inositol e inositídeos envolvidos em processos metabólicos e em estruturas vegetativas (Goya *et al.*, 2011; Valluru e Ende, 2011). O *mio*-inositol pode ser usado para produzir o fosfatidilinositol (PtdIns), polifosfatos *mio*-inositol (Kersting *et al.*, 2003) e solutos compatíveis tais como galactinol, rafinose, família oligossacarídeos, polissacarídeos de parede celular e pinitol (Dastidar *et al.*, 2006).

Estes compostos derivados de *mio*-inositol participam de funções celulares cruciais em plantas, como na transdução de sinais (Stevenson *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2007), transporte de membranas (Thole e Nielsen, 2008), exportação de mRNA (Okada e Ye, 2009), tolerância a estresse (Shevelava *et al.*, 1997) e armazenamento de fósforo (Thole e Nielsen, 2008; Stevenson-Paulik *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2008). Além disso, o *mio*-inositol é produto primário do ácido D-glucurônico, utilizado na síntese de uma variedade de substâncias pécticas da parede celular e compostos não celulósicos além de ácido ascórbico (Loewus e Murthy, 2000; Sasaki *et al.*, 1989; Lorence *et al.*, 2004).

Uma das tecnologias de análise que propiciam uma abrangência de dados é o perfil metabólico. Esta tecnologia proporciona fenotipagem, análise diagnóstica de plantas, auxilia na anotação funcional de genes e na abrangência do entendimento da resposta celular para condições biológica (Schauer e Fernie, 2006). Além disso, uma das grandes vantagens da metabolômica é identificar as alterações secundárias a uma determinada manipulação (Fernie *et al.*, 2004).

O perfil metabólico de compostos primários juntamente com a avaliação das trocas gasosas, fotoquímica e enzimas do estresse oxidativo podem elucidar se há distúrbio e qual a sua grandeza, assim como verificar novas vias influenciadas pelo silenciamento da *MIPS* no corpo vegetativo.

Neste estudo, plantas de tomateiro da progênie T₂ com seis diferentes níveis de silenciamento da *MIPS1* via RNAi foram avaliadas em folhas quanto ao perfil

metabólico primário e de monossacarídeos da parede celular por GC-MS, pigmentos fotossintéticos, açúcares, além de parâmetros fisiológicos e da atividade de enzimas do estresse oxidativo. Essa abordagem apontou alteração no comportamento de metabólitos no corpo vegetativo em plantas silenciadas e a estabilidade fisiológica em plantas contendo redução do conteúdo de *mio*-inositol ou expressão da *MIPS*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal e condições experimentais

Foram utilizadas sementes T₂ de plantas de tomateiro ‘Moneymaker’ transgênico contendo construção tipo *intron-hairpin-RNA* com fragmentos do gene *MIPS* de *Glycine max* ($\Delta GmMIPS$) (Figura 1) indutora de silenciamento da *mio*-inositol-fosfato sintase de origem do vetor de transformação pMIPS1303 inserido na *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 (Figura 2). As sementes foram germinadas entre papel Germitest em câmara de crescimento por um período de 14 dias.

A confirmação da manutenção do transgene foi realizada por PCR com iniciadores para o gene de resistência à higromicina em folhas de plantas contendo 30 dias. As plantas com transgenia confirmada e plantas-controle (WT) foram avaliadas quanto o silenciamento da *mio*-inositol-fosfato sintase (*MIPS1*) por RT-qPCR (Figura 2) e selecionados seis níveis de expressão.

Para cada nível de expressão foram realizadas seis réplicas biológicas através de enraizamento adventício utilizando ramos basais laterais. O enraizamento foi conduzido em vasos de 15 litros, em sistema hidropônico contendo solução nutritiva à ½ força pH 5,7 (Hoagland e Arnon, 1950). O experimento foi conduzido em blocos casualizados, em vasos de 15 litros contendo substrato Plantmax[®] (DDL Agro-Indústria Ltda) em casa de vegetação com temperatura controlada a 25°C até a frutificação.

A parte vegetativa foi avaliada quanto às trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, enzimas do estresse oxidativo, quantificações bioquímicas de açúcares e do perfil metabólico primário e de monossacarídeos de parede celular. As amostragens foram realizadas na folha composta do terceiro entrenó das plantas silenciadas e plantas-controle anterior ao florescimento. Os seis folíolos laterais mais expandidos (três pares) foram utilizados para as coletas fisiológicas e bioquímicas.

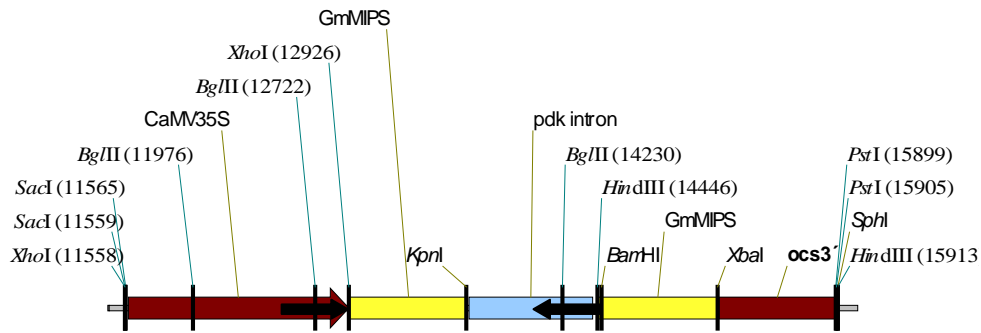


Figura 1. Detalhe do vetor de transformação: sequência indutora de *intron-hairpin-RNA* constituída de promotor *CaMV 35S*, seguido por fragmento de *GmMIPS* no sentido senso, *pdk* intron, repetição antissenso do fragmento de *GmMIPS* e *ocs* terminator.

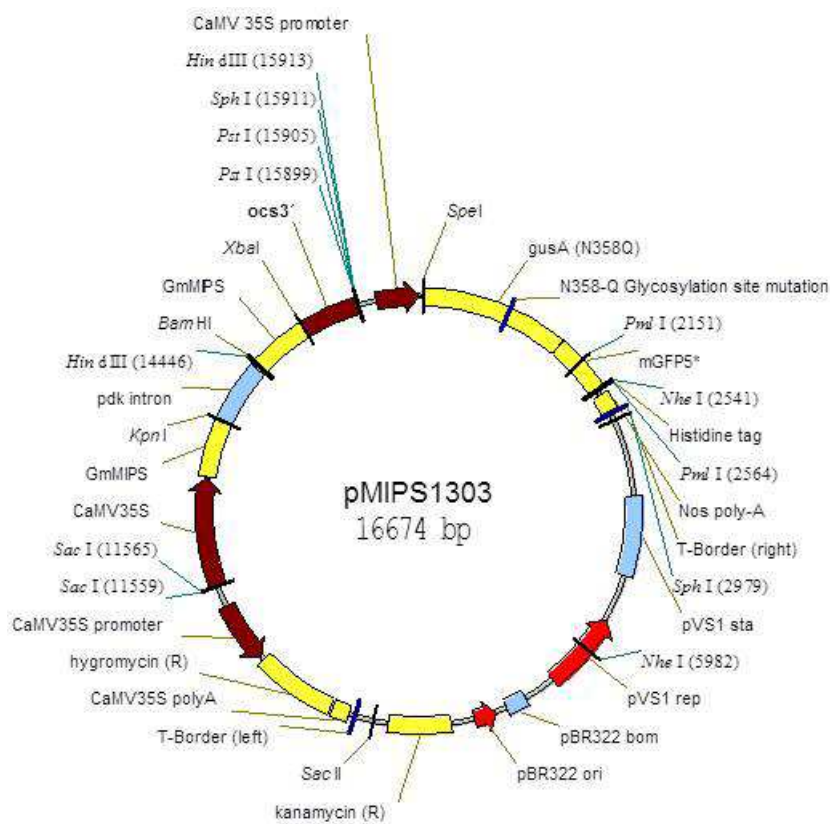


Figura 2. Vetor de transformação inserido na *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101.

4.2.2 Confirmação da integração do transgene por reação da polimerase em cadeia (PCR)

A análise de PCR ocorreu com DNA isolado de discos foliares de plantas da progênie transgênica e plantas-controle utilizando o método CTAB (Doyle e Doyle, 1990). A reação de PCR foi realizada em termociclador (PTC-100, MJ Investigador, EUA) com 50 µL de solução contendo 40 ng de DNA, 60 mM de Tris-SO₄ (pH 8,9), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM de MgCl₂, 250 nm de cada dNTP, 200 nM de cada iniciador 5 U

de Taq polimerase (Invitrogen). A reação foi incubada a 95 °C (5 min) e submetida a 35 ciclos de amplificação (95 °C durante 1 min, 50 °C durante 1 min, 72 °C durante 1 min) com um ciclo de alongamento final de 5 min a 72 °C durante 5 min.

Os iniciadores específicos para o gene de higromicina: 'forward' 5' GCTCCATACAAGCCAACCAC-3' e 'reverse' 5'-CGAAAAGTTCGACAGCGTCTC-3' foram utilizados para amplificar um fragmento a partir de DNA genômico de 670 pb. O DNA amplificado foi detectado no gel de agarose a 0,8% em solução contendo brometo de etídio 10 mg mL⁻¹ e visualizados em transiluminador UV.

4.2.3 Desenho e teste dos oligonucleotídeos para realização da PCR quantitativa de transcrição reversa (RT-qPCR)

A sequência de *MIPSI* GenBank No. AI491091 com expressão em folhas de tomateiro foi utilizada como molde para desenhar os oligonucleotídeos para RT-qPCR. O programa PrimerExpress 2.0 (Applied Biosystems) projetou os oligonucleotídeos com os seguintes critérios: temperatura de anelamento de 55 a 62 °C, comprimento do fragmento amplificado de 70 a 150 pb, comprimento dos oligonucleotídeos de 18 a 25 nucleotídeos e conteúdo guanina-citosina de 40% a 60%.

Quatro genes constitutivos com atividade gênica supostamente inalterada com o silenciamento da *MIPSI* foram testados a fim de determinar a referência interna para a normalização da expressão do gene. Os genes testados foram: actina (accession number BT013524), β -6-tubulina (BT013153), fator de alongamento-1 α (BT013246), e adenina fosforibosiltransferase (APT1) (BT012816) (Alfenas-Zerbini et al., 2009).

A especificidade das quatro sequências *MIPSI* foi verificada na base de dados do NCBI utilizando-se o Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A especificidade de amplificação dos oligonucleotídeos *MIPSI* desenhados e normalizadores foi verificada por meio da análise das curvas de dissociação e por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% revelado com nitrato de prata. O oligonucleotídeo de *MIPSI* e normalizador que apresentou banda única e expressiva em plantas-controle e transgênicas de tomateiro foi escolhido para a RT-qPCR.

4.2.4 Análise da expressão gênica de *MIPSI* por RT-qPCR

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de tecido foliar com o Plant RNA Reagent Invitrogen[®] de acordo com as especificações do fabricante. Após extração, o RNA foi tratado com DNase I Promega[®] e quantificado em aparelho NanoDrop ND-

1000 para ajustar a concentração em $250 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. O cDNA foi sintetizado a partir de 2 μg de RNA com o uso de transcriptase reversa SuperScript® III (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com as especificações do fabricante.

A reação de RT-qPCR foi realizada em placa óptica de 96 poços em aparelho ABI7500 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando o SYBR Green para monitorar a síntese de dsDNA. As reações contiveram 6 μL SYBR Green Master Mix reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 1 μL de cDNA, 300 nM de cada oligonucleotídeo em volume final de 12 μL . As amplificações ocorreram em 50 °C por 2 minutos, 95 °C 10 por minutos e 39 ciclos de 95 °C a 15 s e 60 °C a 1 minuto. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

Os oligonucleotídeos utilizados para o RT-qPCR foram o MIPS1-4 ‘forward’ (5’-TGAAGGAGAGGGTAAGTTCCA-3’) e MIPS1-4 ‘reverse’ (5’-AAAGGAGCCTTGGTAA GATAACTG-3’) para verificar a expressão da *MIPS1* e o APT1 ‘forward’ (5’-CCATGAGGAAACCCAAGAAGT-3’) e APT1 ‘reverse’ (5’-CCTCCAGTCGCAATTAGATCAT-3’) para verificar a expressão de *APT1*. Os níveis de expressão foram normalizados em relação ao gene *APT1* e a quantificação relativa da *MIPS1* foi realizada pelo método comparativo de C_T ($\Delta\Delta C_T$) (Livak e Schmittgen, 2001).

4.2.5 Análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

As análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram realizadas entre 7 e 14h (estabelecido por curva de fotossíntese/tempo) em folhas completamente expandidas, utilizando o folíolo distal lateral da folha do terceiro entrenó, previamente testadas e selecionadas de cada planta. As análises foram realizadas anterior ao florescimento.

As medições de trocas gasosas foram realizadas com um analisador portátil de CO_2 a infravermelho IRGA (LI-6400xt, LI-COR) com luminosidade da câmara fixada em 1000 PAR, temperatura de 25 °C e fluxo de CO_2 do ar ambiente. Foram avaliadas as seguintes características: taxa de fotossíntese (*A*), transpiração (*E*), condutância estomática (g_s), concentração de CO_2 intracelular (*C_i*), densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFA), temperatura da folha (*T_f*), temperatura (*T*) e umidade relativa do ar na câmara (UR). Através dos valores de *A* e *E* foi calculada a eficiência instantânea do uso da água definida pela razão *A/E*. A partir dos dados de

umidade relativa e temperatura da câmara, foram obtidos os valores do déficit de pressão de vapor da atmosfera.

As variáveis de fluorescência da clorofila *a* foram obtidas com um fluorômetro acoplado ao IRGA (LI-6400xt, LI-COR) na mesma área da folha em que foram realizadas as medições de trocas gasosas. Para as avaliações as folhas foram inicialmente adaptadas ao escuro para obtenção das variáveis de indução da fluorescência: fluorescência inicial (F_0) e fluorescência máxima (F_m) e, com estes, foi obtido o rendimento quântico potencial do fotossistema II (FSII), $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$. As variáveis da fase lenta de indução da fluorescência foram obtidas sequencialmente com a aplicação de uma iluminação actínica e um pulso de luz actínica saturante para a determinação das variáveis: fluorescência em amostra adaptada à luz antes do pulso de saturação (F) e fluorescência máxima em amostra adaptada à luz (F_m'). A partir desses parâmetros foi possível calcular a fluorescência mínima do tecido vegetal iluminado, $F_0' = F_0 / [((F_m - F_0)/F_m) + (F_0/F_m')]$ (Oxborough e Baker, 1997), para o cálculo do coeficiente de extinção fotoquímico pelo modelo *lake*, o qual fornece uma estimativa de centros de reações abertos do FSII, $q_L = (F_m' - F)/(F_m' - F_0') \cdot (F_0'/F)$ (Kramer *et al.*, 2004).

O rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no PSII, $Y_{II} = (F_m' - F)/F_m'$; e os rendimentos quântico da dissipação de energia regulada, $Y_{NPQ} = (F/F_m') - (F/F_m)$ e da dissipação de energia não regulada, $Y_{NO} = F/F_m$, foram calculados de acordo com Genty *et al.* (1989) e Hendrickson *et al.* (2004). O Y_{II} foi utilizado ainda para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons, $ETR = Y_{II} \cdot PAR \cdot Abs_{folha} \cdot 0,5$ (Bilger *et al.*, 1995), onde *PAR* é o fluxo de fótons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incidente sobre a folha; 0,5 o valor correspondente à fração de energia de excitação distribuída para o FSII; e, Abs_{folha} o valor correspondente à fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas. O coeficiente de dissipação fotoquímico (q_P) foi calculado pela fórmula: $q_P = (F_m' - F)/(F_m' - F_0')$ e, os coeficientes de dissipação não-fotoquímicos NPQ e q_N , pelas seguintes fórmulas, respectivamente: $NPQ = (F_m - F_m')/(F_m')$, $q_N = (F_m - F_m')/(F_m - F_0')$.

4.2.6 Amostragem e extração de pigmentos fotossintéticos, sacarose, glicose, frutose, glicose-6P, amido e proteínas

Amostras para a quantificação dos pigmentos fotossintéticos e açúcares foram obtidas dois dias após as análises de trocas gasosas, nos horários de 06:00; 12:00, 18:00

e 00:00 horas. Dois discos foliares de 0,8 cm de diâmetro foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em -80 °C, até o momento das análises.

Os pigmentos fotossintéticos e açúcares foram extraídos em série alcoólica de três incubações, consistindo de 250 µL etanol 98%, 150 µL de etanol 80% e 250 µL de etanol 50%. Entre cada etapa, as amostras foram incubadas por 20 minutos a 80 °C, 950 rpm, seguida de centrifugação a 14.000 rpm durante 10 minutos, da qual se coletava o sobrenadante, que era adicionado ao sobrenadante anterior, resultando no extrato alcoólico final.

4.2.7 Quantificação de pigmentos fotossintéticos

Imediatamente após a extração os pigmentos fotossintéticos foram mensurados em placas do tipo ELISA em espectrofotômetro Asys UVM 3440. Para a leitura, uma solução contendo: 120 µL etanol 98% (v/v), 25 µL de mix alcoólico em iguais proporções utilizadas na extração e 25 µL do extrato total foram utilizadas. A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 645 e 665, não ultrapassando a densidade óptica de 0.3 e 0.6, respectivamente. O branco foi constituído de adição de 25 µL de mix alcoólico no lugar da amostra. Os teores de clorofilas *a* e *b* foram calculados utilizando as seguintes equações:

$$\text{Clorofia } a = 5.48 A_{665} - 2.16 A_{645}$$

$$\text{Clorofia } b = 9.67 A_{665} - 3.04 A_{645}$$

Os pigmentos foram expressos por peso fresco.

4.2.8 Quantificação de amido

Para a quantificação de amido e proteínas o sedimento da extração alcoólica foi desidratado por *speedVac* e armazenados a -20°C até a quantificação.

O sedimento desidratado foi lavado com etanol 100% ate completa remoção de clorofilas, e desidratado sobre vácuo. As amostras foram tratadas com 400 µL de KOH 0,2 M durante uma hora a 90 °C e 950 rpm, resfriadas em gelo, centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos e retirado uma alíquota de 25 µL para quantificação de proteínas. Em seguida, as amostras foram neutralizadas com 70 µL de ácido acético a 1M e homogeneizado vigorosamente em vórtex, centrifugado 10 minutos a 14.000 rpm e coletado o sobrenadante. O volume de 100 µL foi hidrolisado com mix contendo por reação (2 Unidades de enzima amiloglicosidase Roche® em 40 µL tampão citrato de

sódio 0.3 M pH 4,6 e 150 μL de H_2O deionizada) mediante incubação durante 20 horas a 55 °C e agitação a 950 rpm.

A quantificação de amido foi realizada em microplaca tipo ELISA. Para isto, foi preparado um mix contendo por reação (7,6 μL de tampão 1M HEPES, 6 μL 50 mM ATP, 6 μL 50 mM NADP, 2 Unidades glicose-6-P-desidrogenase (G6PDH) Roche® Grade II e 129 μL H_2O deionizada). A reação na placa foi formada pelo mix, 3 μL de amido hidrolisado e 290 μL H_2O deionizada. As leituras foram realizadas em espectrofotometro em $\text{OD}_{340\text{nm}}$ com leituras a cada 15 segundos, durante 5 minutos para o estabelecimento da linha de base ou OD inicial. A reação foi iniciada com a adição de 1 Unidade de hexocinase por poço, desta forma a glicose é fosforilada a glicose-6P e esta é oxidada pela G6PDH já presente na reação à gliconato-6P. Esta reação consome NADP e libera NADPH que altera a absorvância que foi mensurada até a estabilização, resultando na OD final. A quantificação de amido foi calculada pelo $\Delta A_{340\text{nm}}$ e a equação da curva padrão de D-glicose determinada para cada placa.

4.2.9 Quantificação de açúcares: sacarose, glicose, frutose e glicose-6P

Para a quantificação de açúcares uma alíquota de 300 μL do extrato foi concentrada através de desidratação completa por *speedVac* e armazenada a -20 °C, até a quantificação.

4.2.9.1 Glicose-6-Fosfato

A glicose-6P foi quantificada a partir do extrato alcoólico em microplaca do tipo ELISA e analisadas em espectrofotômetro $\text{OD}_{570\text{nm}}$ conforme Gibon *et al.* (2004). O meio de reação conteve por poço: 5 μL extrato alcoólico; 70 μL de Tricina KOH a 50 mM com 2,5 mM de MgCl_2 pH 9,0; 2 μL G6PDH Roche® Grade II equivalente a 1,4 U; 2 μL NADP^+ a 2,5 mM e concentrações padrão de glicose-6-P (0, 2, 4, 10, 25 e 100 μM) para a curva de calibração. Esta reação foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente sob agitação de 950 rpm. Nesta reação, a glicose-6P foi oxidada a 6-fosfogluconato produzindo NADPH. A reação teve continuidade com a destruição do NADP^+ restante através da incubação com 20 μL 0,5M NaOH por 5 minutos a 95 °C; após isto, a reação foi neutralizada com 20 μL 0,5M HCl/tampão tricina. Um novo mix de reação protegido da luminosidade, contendo por poço (32 μL de Tricina KOH a 200 mM com 10 mM de MgCl_2 pH 9,0; 2 μL G6PDH Roche® Grade II equivalente a 1,4 U; 2 μL de PMS (Phenazine methosulfate) a 10 mM, 10 μL de MTT (3-(4,5-

Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) a 10 mM; 4 μ L EDTA a 200 mM) foi adicionado para a leitura de base em OD_{570nm}; após, a reação foi iniciada com a adição de 2 μ L de glicose-6-fosfato a 250 mM que ativa a reação cíclica de NADP⁺/NADPH. A concentração de glicose-6-P foi calculada pelo ΔA_{570nm} e equação da curva padrão de glicose-6-P determinada em cada placa.

4.2.9.2 Glicose, frutose e sacarose

A glicose, frutose e sacarose foram quantificadas sequencialmente através de reações enzimáticas sequenciais a partir do extrato alcoólico (Fernie *et al.*, 2001). O primeiro açúcar quantificado foi a glicose. Para esta quantificação o meio de reação contendo por poço (150 μ L de tampão HEPES KOH a 0,1 M com 3 mM MgHCl₂, 4,6 μ L ATP a 60 mg mL⁻¹, 4,6 μ L NADP⁺ a 36 mg mL⁻¹ e 0,8 μ L G6PDH Roche[®] Grade II equivalente a 0,6 U), foi adicionado à 50 μ L do extrato alcoólico e dispostos em microplaca do tipo ELISA e analisados em espectrofotômetro OD_{340nm}. Nessa reação foi realizando inicialmente a linha de base durante 5 minutos com leituras a cada 5 segundos. Após estabelecido a OD inicial, a reação foi iniciada com a adição de 1 μ L de hexocinase a 3 U μ L⁻¹ por poço. A hexocinase realiza a fosforilação da glicose e frutose em glicose-6P e frutose-6P. A glicose-6P é oxidada pela G6PDH já presente na reação a gliconato-6P, esta reação consome ATP e NADP e libera NADPH que altera a absorvância que é mensurada até a estabilização, resultando na OD final.

Em seguida foi realizada a quantificação da frutose. Para tal, uma nova linha de base estabelece a OD inicial, a reação inicia com adição de 1 μ L de fosfoglicose isomerase a 1,4 U μ L⁻¹, que converte a frutose-6P em glicose-6P e esta a gliconato-6P ocorrendo à formação de NADPH que altera a absorvância que é mensurada até a estabilização, resultando na OD final.

Sequencialmente, na mesma placa, a sacarose é quantificada. Uma nova linha de base estabelece a OD inicial, a reação inicia com adição 1 μ L B-fructosidade (0,75 mL do pó dissolvidos em 1 mL de tampão) esta enzima converte sacarose em glicose + frutose e o ciclo se repete com reações de fosforilação e oxidação através das enzimas já presentes na reação, ocorrendo finalmente a formação de NADPH. A quantificação da glicose e frutose é realizada pela equação $\Delta A_{340nm}/(2.85 \times 6.22)$ que mensura a quantidade de μ mol de NADPH produzido, considerando que um NADPH é produzido a cada glicose-6-P oxidada; a quantificação de sacarose o valor deve ser dividido por

dois, devido a ocorrer a formação de dois NADPH por sacarose, uma referente a glicose e outra referente a frutose formadas inicialmente pela atividade da β -fructosidade.

4.2.10 Amostragem para determinação de atividade enzimática, perfil metabólico primário e monossacarídeos de parede

O par de folíolos laterais distais foram coletados entre as 11:30 e 12:30 horas, nesse foi retirado a nervura principal no momento da coleta e congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até as extrações. Essas amostras foram utilizadas para as análises do perfil metabólico primário, monossacarídeos de parede celular e de enzimas do estresse oxidativo.

4.2.11 Determinação da atividade antioxidativa

4.2.11.1 Obtenção do extrato enzimático bruto

Os extratos enzimáticos brutos para as determinações das atividades das catalases (CATs), peroxidases do ascorbato (APXs), peroxidases (POXs) e superóxidos dismutases (SODs) foram obtidos pela pulverização de 0,3 g de tecido vegetal em nitrogênio líquido, e adição de 2 mL de meio de extração (0,1 M fosfato de potássio, pH 6,8; 0,1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA); 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) e 1% polivinilpolipirrolidona (PVPP) em cama de gelo. O homogeneizado foi filtrado através de gaze e centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, coletado o sobrenadante e armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Peixoto *et al.*, 1999).

4.2.11.2 Determinação da atividade das superóxidos dismutases (SODs, EC 1.15.1.1)

A atividade das superóxidos dismutases foram determinadas pela adição de 30 μL do extrato enzimático bruto foliar em 2,97 mL do meio de reação constituído de 50 mM tampão de fosfato de sódio, pH 7,8, contendo 13 mM metionina, 75 μM azul de p - nitro tetrazólio (NBT), 0,1 mM EDTA e 4 μM riboflavina (Del Longo *et al.*, 1993). A reação foi realizada a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ em câmara iluminada com uma lâmpada fluorescente de 15 W mantida no interior de uma caixa fechada. Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida a 560_{nm} (Giannopolitis e Ries, 1977). A absorbância a 560_{nm}, de um meio de reação exatamente igual ao anterior (mantido no escuro por igual tempo), correspondeu o “branco” e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação. Uma unidade das SODs foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50 % a

fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971). O resultado foi expresso em $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

4.2.11.3 Determinação da atividade das catalases (CATs, EC 1.11.1.6).

A atividade das catalases foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático foliar a 2,9 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H_2O_2 a 12,5 mM (Havir e Mchale, 1987). O decréscimo na absorbância em 240_{nm} a 25 °C foi medido durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 de $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ (Anderson *et al.*, 1985) e o resultado expresso em $\text{mmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

4.2.11.4 Determinação da atividade das peroxidases do ascorbato (APXs, EC 1.11.1.1)

A atividade das peroxidases do ascorbato foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981), modificado por Koshiba (1993). As alíquotas de 100 μL do extrato enzimático bruto enzimático foliar foram adicionados a 2,9 mL do meio de reação constituído de 50 mM tampão de fosfato de potássio, pH 6,0, 0,8 mM ácido ascórbico e 1 mM H_2O_2 . O decréscimo na absorbância a 290_{nm} a 25 °C foi medido durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do ascorbato de $2,8 \text{ mM}^{-2} \text{ cm}^{-1}$ (Nakano e Asada, 1981) e o resultado expresso em $\text{mmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

4.2.11.5 Determinação da atividade das peroxidases (POXs, EC 1.11.1. 7).

A atividade das peroxidases foi determinada pelo método de Kar e Mishra (1976). Alíquotas de 100 μL do extrato enzimático foram adicionados a 2,9 mL do meio de reação constituído de 25 mM tampão de fosfato de potássio pH 6,8, 20 mM pirogálico e 20 mM H_2O_2 . O acréscimo na absorbância a 420nm, à temperatura de 25 °C foi medido durante o primeiro minuto pela produção de purpurogalina. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar da purpurogalina $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Chance e Maehley, 1995) e o resultado expresso em $\text{mmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

4.2.12 Análise de metabólitos primários

A extração de metabólitos primários, derivação, adição de padrão e de injeção de amostra para GC-MS foram realizadas de acordo com Lisec *et al.* (2006) com modificações.

4.2.12.1 Extração de metabólitos primários de folhas

Metabólitos primários foram extraídos de 10 mg de tecido foliar liofilizado e pulverizado com nitrogênio líquido com a adição de metanol 100% (1.4 mL) como extrator acompanhado de ribitol (60 µL; 0,2 mg mL⁻¹ em H₂O), como padrão interno, a 2 °C e agitado vigorosamente em vortex. Neste momento a atividade enzimática é paralisada. A extração ocorreu em incubação a 70 °C por 15 minutos. Após centrifugação (14.000 rpm, 10 minutos), o sobrenadante (1,2 mL) foi transferido para vidros de 5 mL de capacidade com tampas rosqueáveis e adicionado 0,75 mL de clorofórmio (CHCl₃) e 1,5 mL de H₂O deionizada e autoclavada. A solução foi agitada em vortex (15 segundos) e centrifugada a 4.000 rpm por 15 minutos.

A fase superior polar, contendo os metabólitos primários, foram coletadas em duas alíquotas de 150 µL as quais foram desidratadas completamente em *speedVac* sem aquecimento. Às amostras desidratadas foram adicionados gás de argônio e armazenadas em ultrafreezer (-80 °C), até o momento das análises.

4.2.12.2 Derivatização da fase polar de folhas.

As amostras foram redessidratadas durante 15 minutos em *speedVac*, após foi adicionado 40 µL de metoxiaminohidroclorido (20 mg mL⁻¹ em piridina). Um tubo contendo igual volume de metoxiaminohidroclorido foi utilizado como branco e, em paralelo, uma extração de folhas de *Arabidopsis thaliana* (em lote já testado) para controle do procedimento. As amostras e controles foram incubados durante 2 hora a 37 °C, sob agitação de 950 rpm. Em seguida, adicionou-se um 70 µL de uma solução contendo 1 mL N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) e 20 µL de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME). Os tubos foram novamente incubados a 37 °C sob centrifugação a 950 rpm, por 30 minutos. O volume de 100 µL foi transferido para os vials para serem aplicados no GC-MS.

4.2.14.3 Análise de dados.

Os espectros de massa foram analisados pelo programa TAGFINDER (Luedemann *et al.*, 2008) alimentado com biblioteca contendo os tempos de retenção e padrão de fragmentação dos metabólitos primários. Depois de identificados e selecionados os valores relativos dos metabólitos foram normalizados pelo padrão interno ribitol, peso da amostra e pela média do valor relativo da planta-controle (WT).

Os valores finais foram analisados pelo teste estatístico *t* Student ($p < 0.05$) e transformados em \log_2 e apresentados em *heatmaps*.

4.2.13 Metabólitos de parede celular

4.2.13.1 Extração e remoção de amido

A extração e remoção de amido ocorreu em 500 mg de material vegetal liofilizado de folhas. Para isto, o pulverizado foi homogeneizado com 1 mL de etanol 70%, centrifugados a 14.000 rpm durante 10 minutos. Ao sedimento foi adicionado clorofórmio:metanol (1:1, v/v) durante 5 minutos sob agitação a 950 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido três vezes ou até completa remoção dos pigmentos. Após esta etapa, o sedimento foi ressuspensão em 1 mL de acetona, centrifugado, e seco sob vácuo.

A remoção do amido da parede celular extraída ocorreu por incubação com 40 unidades de α -amilase por amostra (Roche Applied Science[®]), em 2 mL de Tris-HCl pH 7,0 durante 24 horas. Em seguida a parede celular foi precipitada com centrifugação de 14.000 rpm por 20 minutos e lavada com água desionizada para remoção da glicose e amido e centrifugado 14.000 rpm por 10 minutos para descarte do sobrenadante; esse processo foi repetido três vezes. A parede celular foi precipitada com etanol a 70%, adicionando-se volume apropriado de etanol a 96% à mistura de reação e uma última lavagem e centrifugação foi realizada com acetona, resultando na parede celular que foi seca sob vácuo.

4.2.15.2 Hidrólise ácida para quantificação de monossacarídeos neutros

Material de parede celular (1 mg) foi incubada em 250 mL de 2M ácido trifluoroacético (TFA) em um tubo de ensaio com tampa de rosca de borosilicato durante 1 hora a 121 °C. A suspensão foi diluída com 300 mL de 2-propanol e evaporado a 40 °C repetido três vezes. Em seguida, o sedimento foi ressuspensão em 200 mL de água sob agitação e sonicação por 10 minutos e centrifugadas. Os resíduos insolúveis foram utilizados para medir o teor de celulose através do método de anthrona.

A solução hidrolisada foi utilizada para analisar a composição de açúcares neutros via acetatos de alditol, determinada por GC-MS de acordo Blakeney *et al.* (1983).

4.2.13.3 Açúcares neutros de parede celular.

O volume de 100 µL do hidrolisado foi evaporado a fim de preparar o alditol acetatos. A redução de alditóis foi conseguida por ressuspensão do sedimento em agente de redução (250 µL de borohidreto de sódio em 1M de hidróxido de amônio), adicionado 30 mg de *mio*-inositol por amostra como padrão interno e incubação durante 1 hora à temperatura ambiente. A mistura foi neutralizada pela a adição e 20 µL de ácido acético glacial e em seguida lavou-se cuidadosamente com 250 µL ácido acético: metanol (1:9, v/v) seguido de evaporação a 40 °C, o processo de lavagem e evaporação foi realizado três vezes, seguido por lavagens de 250 µL metanol 100% evaporação a 40 °C também realizado três vezes. A mistura foi acetilada pela adição de 250 µL de anidrido acético e 50 mL de piridina e incubados durante 20 minutos a 121 °C. A reação foi lavada com 200 µL tolueno e evaporado por duas vezes. A limpeza seguiu por adição de 500 µL de água destilada e 500 µL de cloreto de metileno e agitado vigorosamente. A fase apolar inferior foi coletada, evaporada e ressuspensão em 100 µL de acetona. A composição de monossacarídeos hidrolisados foi determinado por GC-MS em um sistema Series GC Agilent 6890 equipado com 5975B inerte XL MSD e fusionado a uma coluna capilar de sílica SP-2380 (30 m x 0,25 mm i.d. x 20 µm de espessura de filme; Supelco).

4.2.13. 4 Quantificação de celulose da parede celular

A celulose, presente no sedimento da hidrólise ácida por TFA para monossacarídeos, foi hidrolisada com a adição de ácido sulfúrico 72% durante 30 minutos em temperatura ambiente e agitação a 950 rpm, seguido de sonicação à

temperatura ambiente durante 15 minutos. Ao final desta etapa foi adicionado 450 μL de água desionizada e agitado vigorosamente e centrifugado a 3.700 rpm durante 5 minutos.

A solução hidrolisada foi analisada pelo teste de anthona, para isto 200 μL foram utilizados para duas replicatas do ensaio. O teste de antrona (Dische, 1962) foi realizado em 100 μL do hidrolisado de celulose e adicionado 200 μL do reagente de antrona 0,2%, aquecido em banho-Maria fervente durante 5 minutos. A leitura foi realizada em 200 μL em placa do tipo ELISA em espectrofotômetro em $\text{OD}_{640\text{nm}}$. O total de hexose foi calculada através de curva padrão de glicose convertido para o total do extrato e total em mg do material extraído. O resultado foi dividido pelo fator 1.11 para acomodar a adição de água durante a conversão do polímero (162 g mol^{-1}) a glicose (180 g mol^{-1}). O resultado foi expresso em $\mu\text{g mg}^{-1}$ de parede celular (Updegraff, 1969).

4.2.13.5 *Quantificação de ácidos urônicos*

A análise de identificação e quantificação de ácidos urônicos ocorreu conforme ensaio de bifênol. Para isto, amostras de 50 μL do hidrolisado para monossacarídeos (TFA hidrólise) foi adicionado 50 μL de água desionizada, 10 μL de reagente de sulfamato (19,44 g de ácido sulfâmico dissolvido em algumas gotas de KOH 24%, volume para 50 mL com água desionizada e pH 1,6), 600 μL tampão borato (0,0125 M borato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) em ácido sulfúrico concentrado), agitado vigorosamente e incubado durante 5 minutos a 121 °C, após, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente durante 10 min. As amostras foram divididas em duas alíquotas, uma de 200 μL para o branco e os 510 μL restantes para a reação de bifênol. Na alíquota de 510 μL foi adicionado 15 μL solução de bifênol (*m*-hydroxy-biphenyl 0,15% em NaOH 0,5%). Após 10 minutos, as amostras com reagente de bifênol foram dispostas em duplicatas, 200 μL cada e 200 μL do branco de cada amostra. A absorbância das amostras na placa foram lidas em comprimento de onda de 540 nm e a concentração foi calculada através de curva padrão com ácido glucurônico e fatores de diluição, os resultados foram expressos em ng mg^{-1} de parede celular (Filisetti-Cozzi e Carpita, 1991).

4.2.14 **Análise estatística**

Os dados de análises bioquímicas e fisiológicas foram submetidos à análise do Teste-*t* ($p < 0.05$).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Confirmação da manutenção do transgene por análise de PCR em plantas T₂ e análise do nível de expressão de *MIPS1* por RT-qPCR

A análise de PCR, utilizando iniciadores para o gene de tolerância a higromicina, confirmou a presença do transgene $\Delta GmMIPS$ (670 pb) no DNA extraído de folhas de plantas T₂. A expressão diferencial de *MIPS1* foi encontrada no cDNA de folhas dos transgenes da geração T₂. O gene normalizador *APT1* se apresentou mais eficiente como controle interno, sendo utilizado em todas as análises de RT-qPCR. Dentre as plantas transgênicas que apresentaram silenciamento foram selecionados 6 níveis de expressão (MT 8.25 = 80%, MT 2.6 = 40%, MT 7.13 = 30%, MT 1.1 = 20%, MT 7.2 = 5% e MT 1.2 = 4%) que foram multiplicadas por enraizamento adventício em seis réplicas biológicas e analisadas nesse estudo (Figura 2).

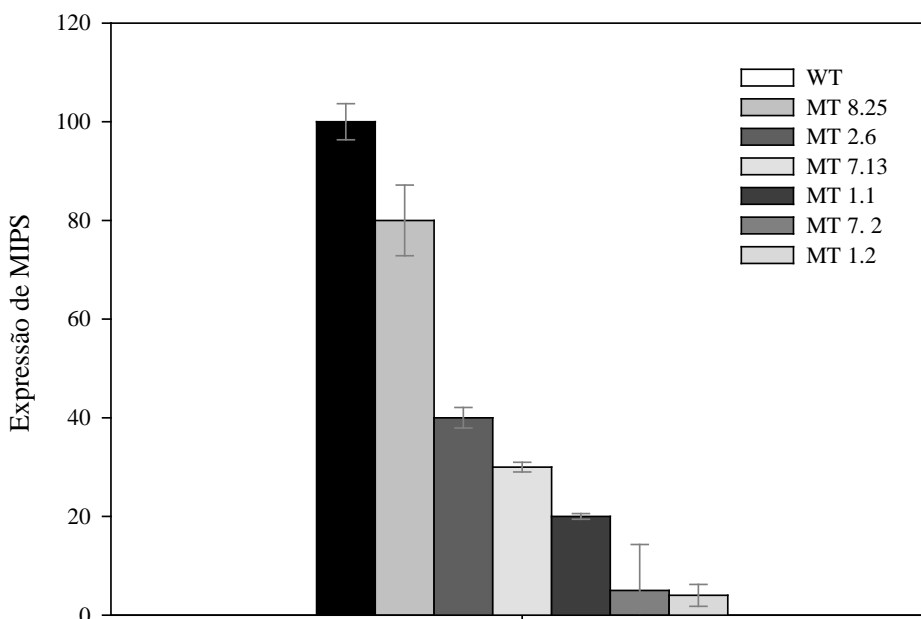


Figura 3. Análise da expressão do gene *MIPS1* em folhas de plantas-controle (WT) e plantas transgênicas silenciadas da progênie T₂ de tomateiro ‘Moneymaker’. Barras indicam o erro padrão (n = 3).

4.3.2 Quantificação de pigmentos fotossintéticos

O conteúdo de clorofilas *a* e *b* não apresentou diferença estatística nas linhagens silenciadas nos horários avaliados de 06:00, 12:00, 18:00 e 00:00 horas, (dados não

mostrados). Estes resultados sugerem que a redução na expressão de *MIPS* não altera a concentração destes pigmentos em folhas de tomateiro.

4.3.3 Quantificação de glicose-6-fosfato glicose, frutose, sacarose, amido e proteína em folhas de plantas-controle e linhagens silenciadas

As quantificações para todos os açúcares, amido e proteínas ocorreram em amostras coletadas as 6:00, 12:00, 18:00 e 00:00 horas. A glicose-6P apresentou acúmulo crescente quanto maior o silenciamento. As linhagens MT 1.2 e MT 1.1 apresentaram o maior acúmulo de glicose-6P, com valores significativos no horário de 12:00 horas. Os demais horários e linhagens não apresentaram diferença significativa.

Durante o período luminoso a glicose-6P acumulou em plantas silenciadas, e este acúmulo foi mais expressivo quanto maior silenciamento. Nos horários onde a fotossíntese líquida reduz, como as 18:00 horas, percebe-se uma tendência de acúmulo, porém menos expressiva de glicose-6P em plantas silenciadas. A relação se inverte no horário não iluminado, e em 00:00 as plantas silenciadas apresentam tendência de redução no conteúdo quando comparada com a planta-controle (Figura 4 A).

Os conteúdos de glicose seguiram tendência apresentada pela glicose-6-P em acumular em plantas silenciadas em horário de alta atividade fotossintética e reduzir em horários com baixa atividade. Porém, essas diferenças não foram significativas quando comparada com o WT (Figura 4 B).

Os conteúdos de frutose seguiram a mesma tendência de acúmulo em plantas das linhagens silenciadas, porém essas diferenças não foram significativas, quando comparada com a WT (Figura 4 C).

A sacarose apresentou acúmulo significativo nas linhagens MT 2.6 e MT 1.1 no horário de 06:00 e não apresentou diferença significativa durante o horário de 12:00 horas nas linhagens silenciadas quando comparado com a WT; porém ao final do dia no horário de 18:00 horas as linhagens MT 7.13, MT 1.1 apresentaram diferença significativa no acúmulo de sacarose e esse conteúdo continuou elevado e significativo no horário de 00:00 em plantas da linhagem MT 1.1 silenciadas (Figura 4 D).

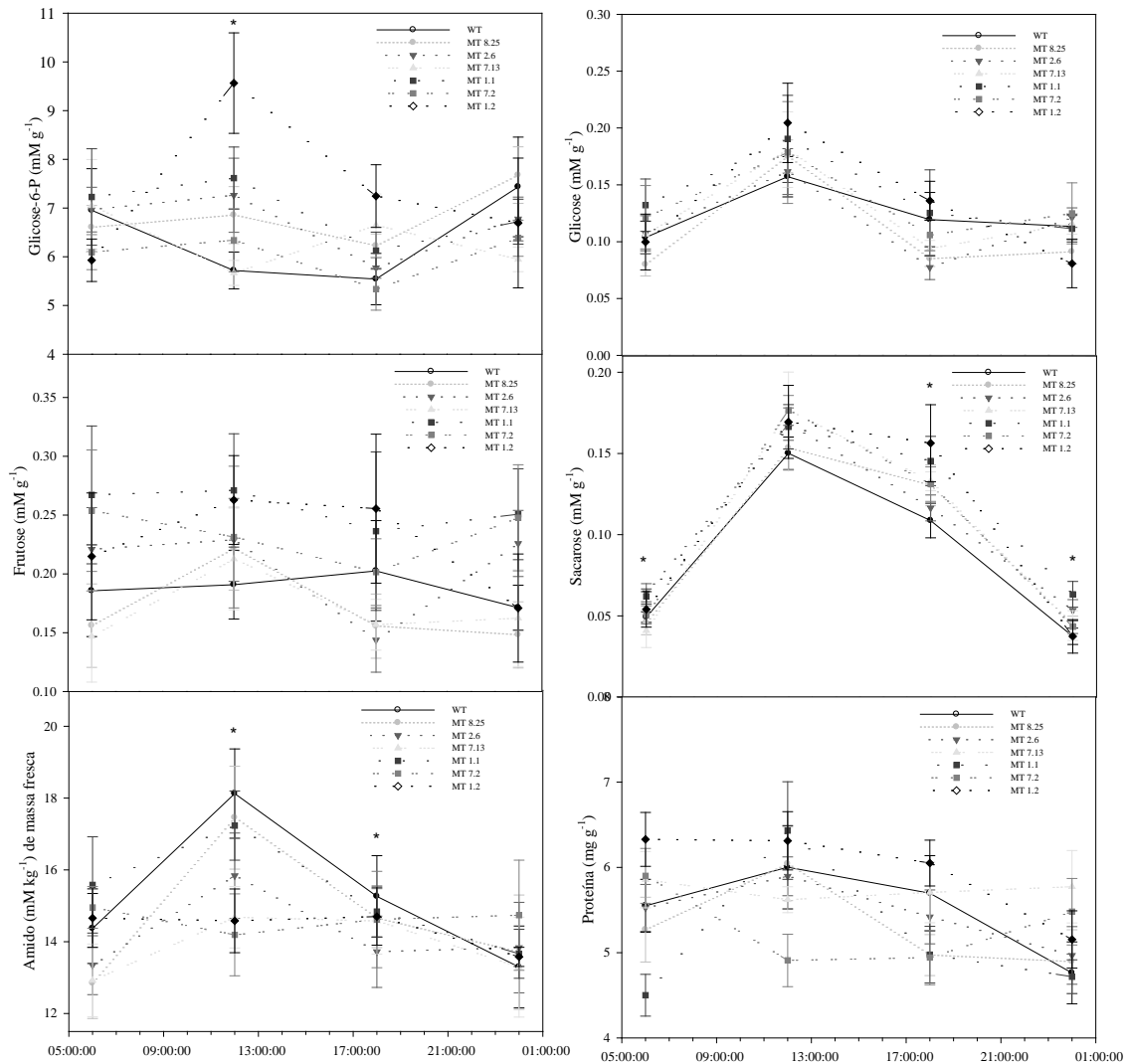


Figura 4. Quantificação de açúcares, amido e proteínas em folhas de plantas-controle (WT) e plantas transgênicas silenciadas da progênie T₂ de tomateiro ‘Moneymaker’ nos horários de 06:00, 12:00, 18:00 e 00:00 horas. Asterisco indica horário com diferença estatística entre as linhagens silenciadas e a plantas-controle. Barras indicam o erro padrão (n = 6).

4.3.4 Trocas gasosas

Todas as análises de trocas gasosas não apresentaram diferença entre as linhagens silenciadas quando comparadas as plantas-controle. As linhagens silenciadas MT 8.25, MT 2.6 e MT 7.13 apresentaram maiores valores na taxa de assimilação líquida do CO₂ (A), porém esta variação não foi significativa (Figura 5 A). A eficiência instantânea do uso da água WUE apresentou tendência ao acréscimo na linhagem MT 1.2 (Figura 5 B), devido a menor taxa transpiratória (E) (Figura 5 D), porém, ambas não significativas. A relação Ci/Ca (Figura 5 C), transpiração (E) (Figura 5 D) e condutância estomática (g_s) (dados não mostrados) não foram significativas.

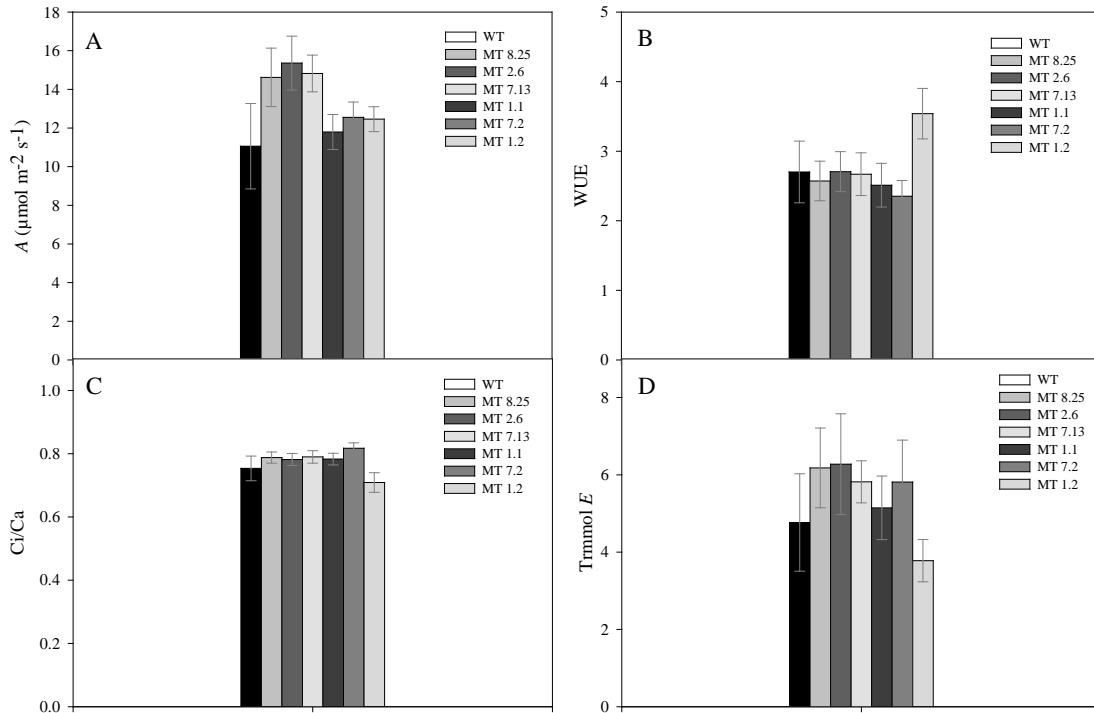


Figura 5. Avaliação de trocas gasosas em folhas de plantas-controle (WT) e linhagens silenciadas da expressão *MIP51* da progênie T₂ silenciada de tomateiro ‘Moneymaker’. A taxa de assimilação fotossintética; razão **Ci/Ca**; **WUE** eficiência do uso da água; **E** taxa de transpiração. Barras indicam erro padrão (n = 6).

4.3.5 Fluorescência da clorofila *a*

Todas as análises de fluorescência da clorofila *a* não apresentaram diferença entre as linhagens silenciadas quando comparadas as plantas-controle. A taxa de transporte de elétrons do FSII (ETR) e o rendimento quântico de conversão fotoquímica de energia no FSII (Y_{II}) apresentaram tendência ao acréscimo, porém não significativo (Figura 6 A e D), acompanhado de uma tendência de aumento no coeficiente de extinção fotoquímica (q_L), o qual estima o centro de reações abertos do FSII (Figura 6 C). As plantas-controle e as linhagens silenciadas não apresentaram alterações significativas na fluorescência basal (F_0) e no rendimento quântico máximo do fotossistema II (FSII; F_v/F_m) (Figura 6 E e F). A dissipação térmica de energia no FSII via ciclo das xantofilas, avaliada pelo coeficiente de dissipação não fotoquímico (NPQ), não apresentou diferença entre os níveis de silenciamento, assim como o $Y_{(NPQ)}$ que indica a dissipação térmica potencial de energia pelo FSII e o (Y_{NO}) que indica o rendimento quântico não regulado da dissipação de energia no FSII também não foi alterado significativamente pelos níveis de silenciamento (dados não apresentados).

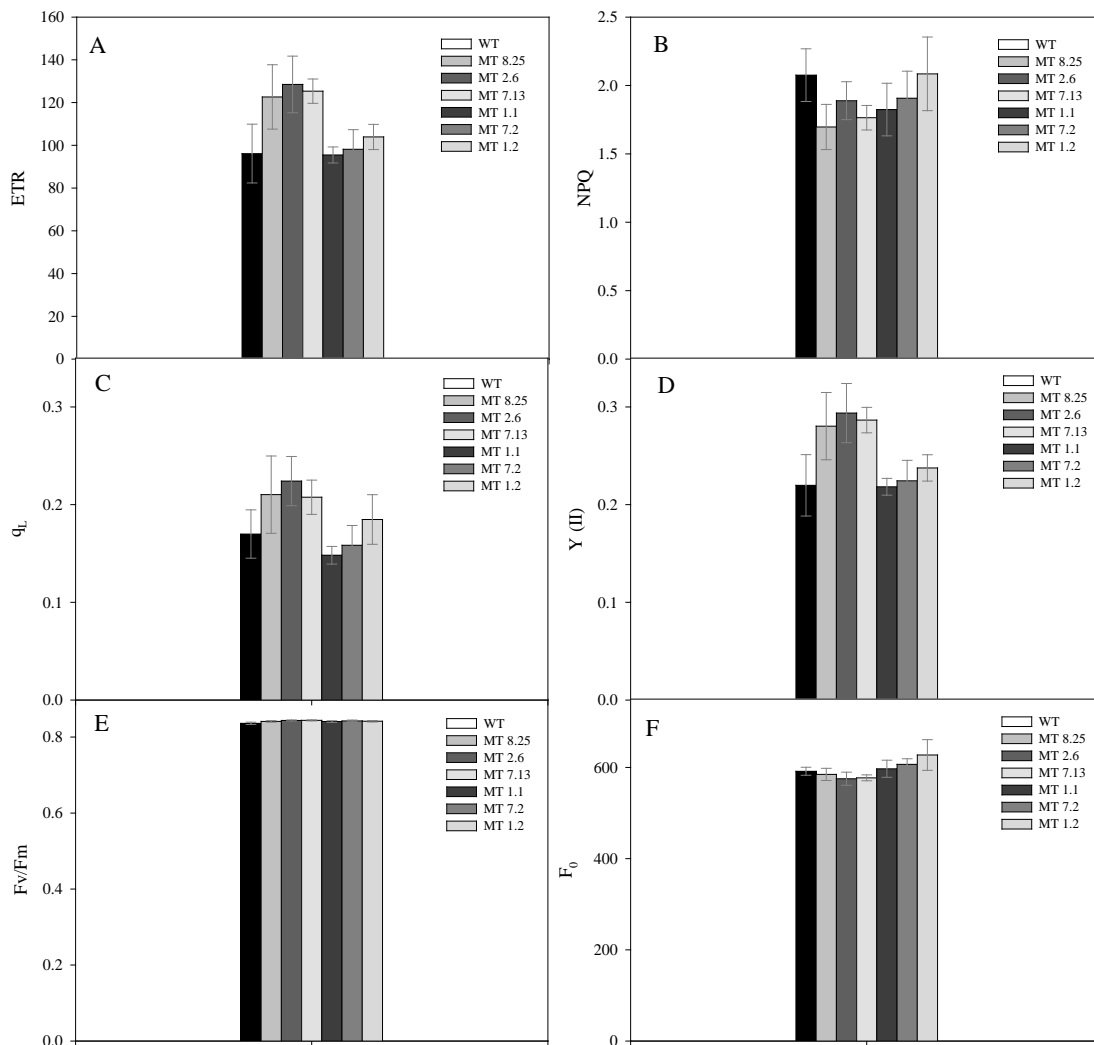


Figura 6. Avaliação da fluorescência da Clorofila *a* em folhas de plantas-controle (WT) e plantas transgênicas silenciadas da progênie T₂ silenciada de tomateiro ‘Moneymaker’. **ETR** - Taxa de Transporte de Elétrons em PSII; **q_L** - Coeficiente de extinção fotoquímico; **F_v/F_m** - rendimento quântico máximo do fotossistema II; **NPQ** - coeficiente de dissipação não-fotoquímica; **Y_{II}** - Rendimento quântico efetivo do fluxo de elétrons linear em PSII; **F₀** - Fluorescência após adaptação ao escuro. Asterisco indica diferença estatística pelo Teste-*t* (p < 0,05%) entre a planta controle (WT) e as linhagens silenciadas. Barras indicam erro padrão (n = 6).

4.3.6 Determinação da atividade antioxidativa

A atividade das enzimas catalases (CATs) e peroxidases do ascorbato (APXs) não apresentaram diferença significativa entre as linhagens silenciadas e as plantas-controle (Figura 7 A e C). A atividade das peroxidases (POXs) apresentou aumento significativo na linhagem MT 1.2 (Figura 7 B) enquanto a atividade das superóxido dismutases (SODs) reduziu significativamente na linhagem MT 1.2 (Figura 7 D).

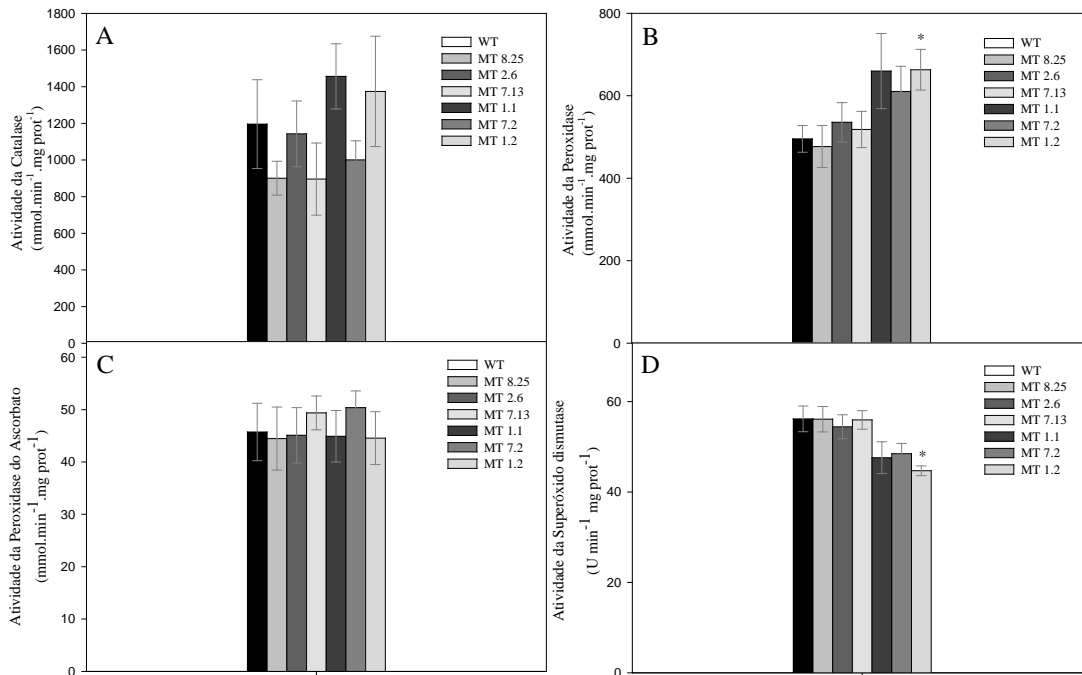


Figura 7. Determinação da atividade antioxidativa folhas de plantas-controle (WT) e plantas transgênicas silenciadas da progênie T₂ de tomateiro ‘MoneyMaker’. **A-** Atividade da catalase; **B-** Atividade da peroxidase; **C-** Atividade da peroxidase do ascorbato e **D-** Atividade da superóxido dismutase. Asterisco indica diferença estatística pelo Teste-t ($p < 0.05$) entre a planta controle (WT) e as linhagens silenciadas. Barras indicam erro padrão ($n = 6$).

4.3.7 Análise de metabólitos primários

Os aminoácidos não apresentaram padrão coordenado de abundância, sendo que os aminoácidos glutamato, isoleucina, fenilalanina, serina, treonina e valina apresentaram acúmulo significativo quando comparado a WT; já os aminoácidos aspartato, glutamina, isomaltose, tiramina, apresentaram redução significativa da sua abundância quando comparada a WT.

Dos ácidos orgânicos avaliados, apenas o glicerato apresentou acúmulo e o quinato apresentou redução na abundância quando comparado com as plantas-controle.

Dos intermediários do ciclo TCA apenas o conteúdo de piruvato foi alterado significativamente, resultando em redução de sua abundância.

Os açúcares apresentaram alterações mais expressivas em seus níveis, onde foram alterados em sua abundância no acúmulo em celobiose, frutose, frutose-6-P, fucose, trealose e xilose e redução do acúmulo em ramnose.

Os açúcares álcool apresentaram redução nos níveis em relação à WT, com redução significativa observada para galactinol, glicerol, *mio*-inositol, *mio*-inositol-1-P e lactitol (Figura 8).

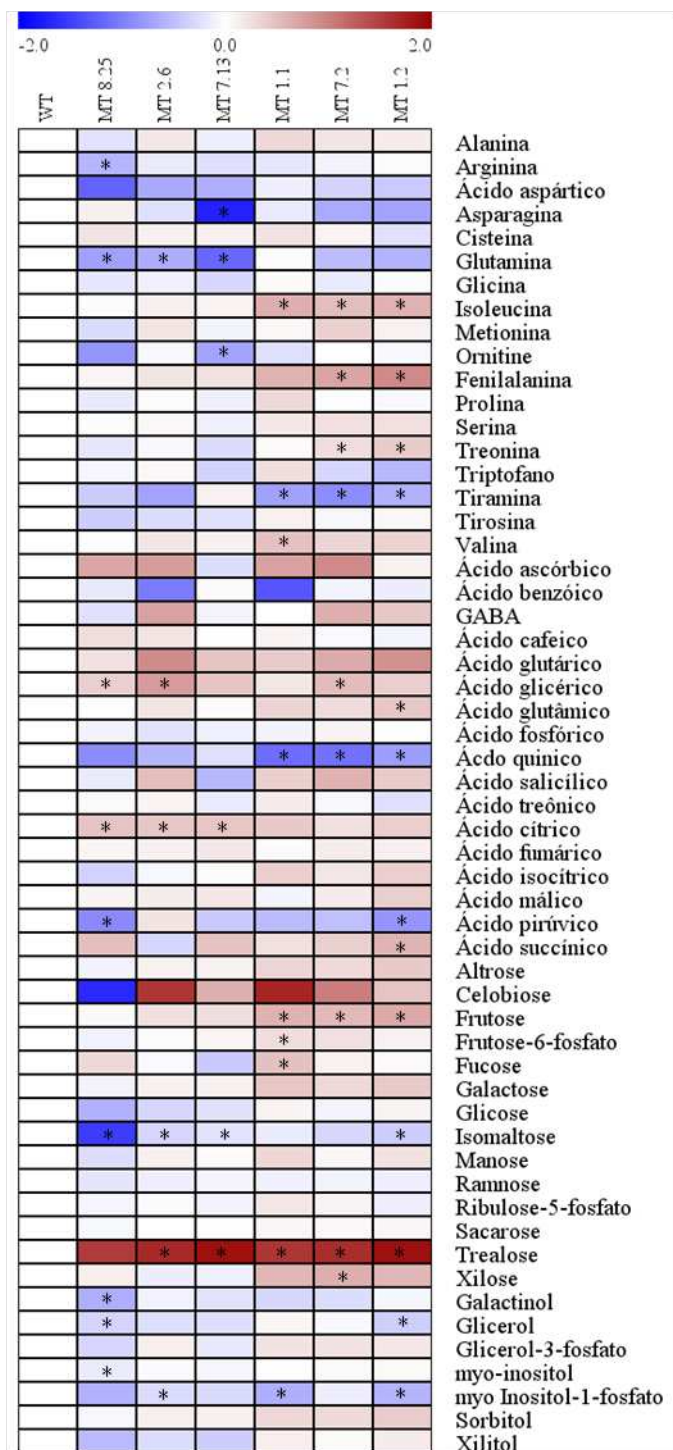


Figura 8. Efeito do silenciamento de *MPIS1* no perfil metabólico em folhas de tomate. Metabólitos foram identificados em folhas de plantas-controle (WT) e plantas apresentando seis níveis de silenciamento da expressão de *MPIS1*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à média das plantas WT e transformados em log₂. Diferentes tons de vermelho e azul expressam a extensão das mudanças nos níveis dos metabólitos segundo a barra de referência. Os asteriscos indicam diferença significativa pelo Teste t de Student ($p > 0.05$) em comparação com os valores obtidos para o WT ($n = 6$). Os valores absolutos encontram-se nos Dados Suplementares.

4.3.8 Açúcares de parede celular, celulose e ácidos urônicos

O conteúdo de açúcares de parede celular apresentaram o menor conteúdo em ramanose na linhagem MT 2.6 quando comparado à abundância da plantas-controla com as linhagens silenciadas em folhas, a redução em ramanose também foi identificada no perfil de metabólitos primários. Os demais metabólitos (galactose, glicose, manose, arabinose e xilose) não apresentaram diferença significativa (Figura 9).

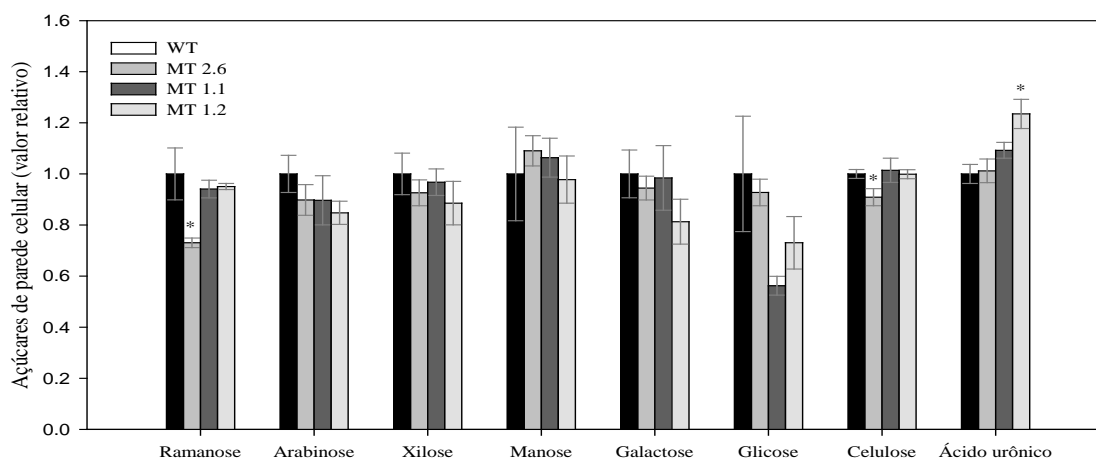


Figura 9. Quantificação de açúcares de parede celular, celulose e ácido urônico em folhas de plantas-controla (WT) e plantas transgênicas silenciadas para a expressão da *MIPS1* da progênie T₂ de tomateiro 'Moneymaker'. Asterisco indica diferença estatística pelo Teste-*t* ($p < 0,05$) entre a planta controle (WT) e as linhagens silenciadas. Barras indicam erro padrão ($n = 6$). Os valores absolutos encontram-se nos Dados Suplementares.

O conteúdo de celulose foi modificado pelo silenciamento de *MIPS1* na linhagem MT 2.6. Os ácidos urônicos foram alterados apresentando crescente acúmulo em resposta ao silenciamento, apresentando diferença significativa na linhagem MT 1.2.

4.4 DISCUSSÃO

As linhagens silenciadas para a sintase de *mio*-inositol-3-fosfato, selecionadas de plantas transgênicas T₂ apresentaram alterações nas respostas fisiológicas e conteúdos de metabólitos estreitamente relacionados ao metabolismo de *mio*-inositol na parte vegetativa de tomateiros ‘Moneymaker’. Essas alterações assumem que direta ou indiretamente a demanda do *mio*-inositol e níveis de expressão da *MIPSI* são cruciais para a regulação fisiológica em plantas. A biossíntese de *mio*-inositol é um processo altamente regulado, envolvido em diferentes e importantes vias bioquímicas do metabolismo vegetal (Seelan *et al.*, 2009; Torabinejad *et al.*, 2009).

O conteúdo de amido, glicose-6P, glicose, frutose e sacarose apresentaram alterações em folhas das linhagens silenciadas. O conteúdo de amido foi reduzido em plantas silenciadas, especialmente nos horários de presença de fotossíntese. Sulpice *et al.* (2009) afirmam que o amido e o *mio*-inositol não apresentam correlações diretas quando relacionados os níveis desses metabólitos com os transcritos e o ganho de biomassa em 94 acessos de *Arabidopsis*; porém glicose, frutose e sacarose foram altamente correlacionados, sendo o amido correlacionado aos conteúdos de sacarose. Tognetti *et al.* (2013) relatam que a sacarose possivelmente atua como uma molécula de sinalização que inicia ou ativa a síntese de amido. Vários estudos demonstraram a regulação positiva por sacarose de diversos genes relacionados com a via biossintética do amido, tais como os que codificam as subunidades específicas da ADP-glicose pirofosforilase (AGPase) em diferentes espécies (Nagata *et al.*, 2012).

No presente trabalho, os conteúdos de glicose-6P apresentaram acúmulo em plantas silenciadas durante os horários de alta atividade fotossintética e o acúmulo do açúcar foi maior quanto maior o silenciamento de *MIPSI*. A glicose-6P é o substrato da reação da *mio*-inositol-3-fosfato sintase (E.C.5.5.1.4) – *MIPS*, na síntese de *mio*-inositol através da conversão irreversível de D-Glicose-6-P para 1-L-*mio*-inositol-1-P (Majumder *et al.*, 1997). Durante o horário de 18:00 horas dois níveis silenciados ainda apresentavam maior acúmulo desse açúcar; porém no horário noturno, verificamos que a demanda deste açúcar é maior em plantas silenciadas, apresentando redução do conteúdo em plantas contendo silenciamento acima de 40%. Isso pode ser devido à síntese de outras moléculas que possuem o *mio*-inositol como via alternativa. A redução dos conteúdos de *mio*-inositol afetaria o fluxo de vias alternativas, assim, as vias principais geralmente constituídas de substratos como UDP-glicose demandam a

necessidade exclusiva de glicose, esgotando os conteúdos armazenados ou o fluxo de glicose-6-P, glicose e amido durante os horários sem a presença de fotossíntese. Como exemplo de via alternativa de síntese que utiliza o *mio*-inositol e possui UDP-glicose como via principal, tem-se a via de síntese de xilose (Klinghammer e Tenhaken, 2007), pectina e hemicelulose (Loewus *et al.*, 1958).

Os conteúdos de glicose e frutose seguem a tendência similar à glicose 6-P em acumular em plantas silenciadas nos horários com fotossíntese ativa. Os conteúdos de glicose aumentam pela redução da síntese de *mio*-inositol, diminuindo o fluxo de glicose para essa síntese; enquanto isso, os conteúdos de frutose aumentam devido ao acúmulo daqueles de glicose. O acúmulo dos dois monossacarídeos glicose e frutose resultam no potencial e real acúmulo do dissacarídeo sacarose; assim, todas as alterações de conteúdo responderam diretamente à abundância de seu substrato.

A alteração dos conteúdos de sacarose pode provocar várias mudanças nos tecidos vegetais, acredita-se que sacarose possui papel de sinalização celular. A sacarose está constitutivamente presente em vegetais e por isso é necessário que a sua concentração exceda um determinado limite para desempenhar a função sinalizadora (Pollock *et al.*, 2003). De um modo geral, a sacarose acumula *in vivo* quando a utilização de carboidratos é menor que a síntese, como quando as plantas são expostas a temperaturas frias sob alta irradiância (Pollock, 1990). Além disso, a sinalização intracelular por sacarose é um processo complexo e componentes adicionais são necessários. Por exemplo, a sacarose aumenta os níveis de trealose-6P e este composto por sua vez é considerado uma molécula sinal que controla o metabolismo do carbono e crescimento (Lunn *et al.*, 2006).

Efeitos no conteúdo de pigmentos fotossintéticos eram esperados uma vez que o *mio*-inositol é requerido na síntese de membranas e compostos pécticos, presentes em grande quantidade nos cloroplastos (Sharpley e Fry, 2007). Além disto, os fosfatidilinosítídeos se apresentam como moléculas de ancoragem a proteínas de membranas, envolvidas nas respostas celulares a estímulos ambientais, luminosos e biossíntese de membranas (Nakazato *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 1996). Porém essa alteração não foi evidenciada em nenhuma linhagem silenciada.

Outro fator que poderia contribuir para a alteração dos conteúdos de pigmentos seria o conteúdo alterado de moléculas envolvidas no processo fotossintético, como descrito por Tognetti *et al.* (2013) em relação ao processo de sinalização da sacarose em plantas. Nesse, a sacarose controlaria a síntese de clorofila e de pigmentos não-

foto-sintéticos, este processo foi verificado através do fornecimento de sacarose em meio de culturas *in vitro*; esse tratamento impediu acúmulo de clorofila em culturas de calos de cenoura (Edelman e Hanson, 1971). Em seguida foi proposto que a sacarose afetaria a síntese do precursor de clorofila, o ácido 5-aminolevulínico (Pamplin e Chapman 1975), porém a diminuição de clorofila não acarretaria em plantas menos verdes, uma vez que Kumar *et al.* (1985) relataram um aumento do número de cloroplastos em explantes de raízes de cenoura tratados com sacarose.

As modificações nos conteúdos de inositol e inosídeos não foram suficientes para resultar em alterações em nível de maquinaria foto-sintética. O ajustamento das rotas metabólicas tende a manter os processos fisiológicos vitais em equilíbrio para a sobrevivência do organismo e a foto-síntese é um dos principais processos fisiológicos da planta.

Na avaliação de trocas gasosas, verificou-se que as plantas silenciadas não possuem alteração na condutância estomática, relação Ci/Ca ou transpiração; foto-síntese líquida e eficiência do uso da água (WUE).

As plantas-controle e silenciadas não apresentaram estresse, uma vez que não apresentaram diferença significativa no aumento na dissipação do excesso de energia absorvido, avaliados através do rendimento quântico regulado (Y_{NPQ}) e não regulado (Y_{NO}) de energia; mas ao contrário, apresentaram tendência ao aumento no rendimento quântico de conversão fotoquímica de energia no FSII (Y_{II}) como citado anteriormente. Os Y_{II} , Y_{NPQ} e Y_{NO} são competitivos entre si (Eskling *et al.*, 1997). O acréscimo do Y_{II} não foi acompanhado por alterações significativas Y_{NPQ} .

A dissipação de energia via Y_{NPQ} envolve dissipação de energia ΔpH (bombeamento de H^+ para o lúmen do tilacóides) e/ou dissipação de energia na forma de calor pelo ciclo das xantofilas (Horton *et al.*, 1996; Niyogi, 2000; Hendrikson *et al.*, 2004). Esse mecanismo de dissipação não-fotoquímica tem sido efetivo em plantas expostas a estresses (Wilson *et al.*, 2007; Pereira, 2009). A zeaxantina, componente do ciclo das xantofilas, tem sido indicada em participar do processo de reparo do FSII e pode ser crítica na proteção deste foto-sistema, importante na degradação de proteínas não funcionais e substituição da D1 (Jin *et al.*, 2003). A dissipação térmica ocorre pela alteração em sua conformação devida as ligações de prótons e da zeaxantina às proteínas da antena coletora de luz (Demmig-Adams e Adams, 1996; Horton *et al.*, 1996), e está envolvida na proteção do maquinário foto-sintético contra a

superexcitação (Krause e Weis, 1991; Ort e Baker, 2002) e proteção contra danos e, ou síntese de novo da proteína D1 do FSII (Jin *et al.*, 2003).

Y_{NO} envolve a reemissão como luz pela molécula do centro de reação, ou ainda indica que a energia pode ser reemitida de forma não radiativa pelas moléculas de clorofila do complexo coletor de luz (Hendrikson *et al.* 2004). Valores altos de Y_{NO} refletem a incapacidade da planta de se autoprotoger do excesso de energia luminosa absorvida (Klughammer e Schreiber, 2008). Confirmando que as plantas avaliadas não estavam sob estresse pois esta variável não se alterou entre as planta-controle e os níveis silenciados.

A ausência de estresse também foi verificada através da avaliação da atividade de enzimas do estresse oxidativo. As enzimas APX, POX e catalase não apresentaram diferença entre as plantas-controle e os níveis silenciados, e ainda, a atividade da enzima SOD apresentou decréscimo em plantas silenciadas, o que indica que as plantas não estavam utilizando o mecanismo antioxidante enzimático por não haver necessidade, como também indica os parâmetros de fluorescência da clorofila *a*.

As enzimas SODs e APXs estão envolvidas no ciclo água-água contribuindo para o dreno não linear de elétrons entre os FSII e FSI (Niyogi, 1999). Quando existe sobrecarga de elétrons na cadeia de transporte, pode ocorrer a formação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) no lado acceptor do PSI pela redução do O_2 o qual é eficientemente metabolizado pela SOD a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em seguida, a APX utiliza ascorbato como substrato para formar água e monodeidroascorbato na membrana do tilacóides (Müller, 2011).

A metaloenzima SOD é o antioxidante enzimático intracelular mais efetivo, ela é onipresente em todos os organismos aeróbicos e em todos os compartimentos subcelulares propensos a espécies reativas de oxigênio (EROs) através do estresse oxidativo. Os vários estresses ambientais muitas vezes levam ao aumento da geração de EROs. A SOD é importante na tolerância ao estresse de plantas por fornecer a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos dos níveis elevados de EROs. As SODs removem o $O_2^{\bullet-}$ catalisando a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ reduzindo a H_2O_2 e outro oxidado a O_2 . Ela remove $O_2^{\bullet-}$ e, portanto, diminui o risco de formação de OH^{\bullet} através da catálise metálica via reação Habere-Weiss. Esta reação tem taxa 10.000 vezes mais rápida que a dismutação espontânea. A quantificação de sua atividade, demonstrando redução na atividade em plantas silenciadas reitera a ausência de estresse nessas plantas.

Os metabólitos primários apresentaram as variações mais expressivas e condicionadas ao metabolismo de inositol. Os açúcares foram em sua maioria acumulados, apresentando o mais expressivo acúmulo em trealose e frutose; os demais açúcares, celobiose, frutose-6-P, fucose e xilose, também apresentaram acúmulo em menor quantidade de linhas silenciadas. A trealose e frutose apresentaram maior quantidade de níveis alterados devido a sua estreita relação com o metabolismo de *mio*-inositol. O silenciamento da sintase do *mio*-inositol fosfato, reduz a conversão de glicose-6-P a *mio*-inositol. Dessa forma o pool de glicose-6-P fica livre para seguir outras vias de biossíntese.

A biossíntese de trealose possui duas etapas enzimáticas catalisadas pela sintetase de trealose-6-fosfato (STP) e trealose-fosfatase (TPP). A STP catalisa a transferência de glicose a partir de UDP-glicose para a glicose-6-fosfato formando trealose-6-fosfato (T6P) e UDP, enquanto TPP desfosforila T6P a trealose e fosfato inorgânico (Scherzinger *et al.*, 1997; Mackenzie *et al.*, 1988). O metabolismo e a síntese de trealose têm sido propostos como parte do sistema de sinalização de açúcar na planta (Eastmond e Graham, 2003; Schluepmann e São Paulo, 2009) e sinais hormonais de resposta a estresse, especialmente durante o estresse e desidratação pelo calor (Wiemken, 1990; Crowe *et al.*, 1998). Em particular, os níveis de T6P foram considerados altamente correlacionados com o teor em sacarose, que conduz à sugestão de que T6P atua como um sinal de estado de sacarose em plantas (Lunn *et al.*, 2006). Um papel direto para T6P na promoção da síntese de amido, através da ativação redox de enzima ADP-glicose pirofosforilase (AGPase) localizada no cloroplasto, com correlação entre o aumento dos níveis de T6P, ativação redox de AGPase e aumento das taxas de síntese de amido (Lunn *et al.*, 2006). Zhang *et al.* (2009) sugere um modelo em que o crescimento e reações biossintéticas são induzidas por T6P em resposta a disponibilidade de sacarose.

O aumento na abundância de frutose possivelmente foi devido aos maiores conteúdos de glicose e glicose-6P. Os açúcares álcool apresentaram redução, a mais expressiva foi encontrada em *mio*-inositol-1P, reduzida significativamente em quatro dos seis níveis silenciados. A *mio*-inositol-1P é resultado da conversão irreversível de D-glicose-6-P para 1-L-*mio*-inositol-1-P (Majumder *et al.*, 1997), que está silenciada nesse estudo. O galactinol e o glicerol apresentaram redução significativa em dois níveis de plantas silenciadas enquanto o lactitol e o *mio*-inositol apresentaram apenas um nível de diferença significativa. A redução na abundância de galactinol pode ser resultado da

redução da abundância de *mio*-inositol. O galactinol é sintetizado via sintase do galactinol (GOLS; EC 2.4.1.123), que realiza a transferência do resíduo de galactose da UDP-galactose para o inositol, formando o galactinol (Peterbauer e Richter, 2001; Liu *et al.*, 1993), que por sua vez é controlado em nível de substrato (*mio*-inositol) e fatores de resposta ao estresse (Karner *et al.*, 2004). Galactinol e oligossacarídeos de rafinose são compostos específicos de plantas sem representantes em outros reinos. A evolução especializada da galactinol sintase entre as plantas, sem haver registros em outros reinos, indica um importante papel deste grupo de compostos em plantas (Sengupta *et al.*, 2012).

Entre os intermediários do ciclo TCA avaliados, o citrato, fumarato, isocitrato, malato e succinato não apresentaram diferença significativa, enquanto o piruvato apresentou diferença significativa nas plantas silenciadas quando comparado com as plantas-controle. O piruvato tem origem da glicólise, sendo o último metabólito produzido da oxidação da glicose e é um dos metabólitos que alimenta o TCA. Embora o papel do ciclo de TCA em produção de energia seja bem definido, este ciclo tem uma infinidade de outras funções, como atender a demanda de esqueletos carbônicos imposta pelos processos anabólicos, tais como síntese de aminoácidos (Douce e Neuburger, 1989; Mackenzie e McIntosh, 1999), síntese de isoprenóides (Fatland *et al.*, 2005), regulação de redox celular (Scheibe *et al.*, 2005) e o controle do balanço de carbono/nitrogênio (Noguchi e Terashima, 2006). A alteração em apenas um dos intermediários do TCA não foi suficiente para afetar os demais intermediários do ciclo, apresentando uma regulação refinada e manutenção das características fisiológicas em plantas silenciadas. Desta forma podemos afirmar que os intermediários do TCA em plantas silenciadas não são alterados na parte vegetativa pelo silenciamento da *MIPS1*.

O catabolismo de aminoácidos é geralmente canalizado para o ciclo do TCA estes podem ter suprido qualquer necessidade de manutenção do TCA. O comportamento dos aminoácidos por sua vez apresentou um grupo contendo acúmulo de abundância (glutamato, isoleucina, fenilalanina, serina, treonina e valina) e outro grupo contendo redução de abundância (aspartato, glutamina, isomaltose e tiramina) em plantas silenciadas quando comparada a WT. A função clássica dos aminoácidos é na síntese de proteínas, mas todos podem ser catabolizados no ciclo do TCA a fim de contribuírem para o metabolismo de energia celular (Galili, 2011).

Outra intervenção no metabolismo pode ser provocada pela sinalização de sacarose no metabolismo de nitrogênio, uma vez que este açúcar parece controlar não só

a assimilação e transporte de nitrogênio, mas também o balanço de carbono:nitrogênio. Tem sido relatado que a sacarose provoca acumulação da nitrato redutase (NR) e acumulação de mRNA em plantas verdes de *A. thaliana* adaptadas ao escuro (Cheng *et al.*, 1992) e outras eudicotiledôneas (Kaiser *et al.*, 2001; Morcuende *et al.*, 1998). A sacarose não aumenta apenas a expressão do gene NR, mas também a atividade (Morcuende *et al.*, 1998) e ativação enzimática pós-traducional (Kaiser *et al.*, 2001; Morcuende *et al.*, 1998). O efeito da sacarose na expressão NR é tão determinante que pode substituir a regulação positiva do nitrato na expressão da NR (Klein *et al.*, 2000). Além disso, a sacarose estimula a rota biossintética de aminoácidos (Hanson *et al.*, 2008) o fluxo de carbono da glicólise para ácidos orgânicos, uma vez que uma diminuição de 3-fosfoglicerato e PEP e um grande aumento de α -oxoglutarato foram encontrados em plantas de tabaco tratadas com sacarose (Morcuende *et al.*, 1998).

A composição dos açúcares neutros de parede celular (arabinose, xilose, manose, galactose e manose) não foram alterados em folhas, apenas o conteúdo de ramnose apresentou decréscimo na planta contendo 20% de expressão da *MIPS*. A fucose não foi identificada no extrato foliar nas linhas silenciadas avaliadas por análises de GC-MS sugerindo que não houve grande alteração no polímero hemicelulose. Polissacarídeos da parede celular são sintetizados pelas glicosiltransferases ligadas à membrana celular utilizando nucleotídeos de açúcar presentes no citosol, tais como uridina-5 difosfoglicose (UDP-Glc), guanossina difosfomanose (GDP-Man) e UDP-ácido glucurônico (UDP-GlcA) (Sharples e Fry, 2007). UDP-GlcA podem ser produzidas de duas maneiras: a partir de UDP-Glc (UDP-Glc desidrogenase), ou a partir de inositol, através do *mio*-inositol oxigenase (MIOX) (Lorence *et al.*, 2004). A via MIOX converte inositol ao ácido glucurônico o qual pode ser ainda fosforilado para gerar ácido glucurônico-1-fosfato, que é então convertido em UDP-GlcA fornecendo nucleotídeos de açúcares necessários para a síntese da parede celular em uma reação termodinamicamente irreversível (Endres e Tenhaken, 2009).

Nesse estudo demonstramos que a redução de *mio*-inositol não altera significativamente a composição de parede celular em folhas de plantas silenciadas para *MIPS*. A importância em encontrar modificações na composição da parede celular estão focadas para a conversão da matriz lignocelulósica a etanol, melhorando a extração de moléculas de açúcar ou por meio de reduções do polímero polifenol de lignina (Carroll e Somerville, 2009). No entanto apenas um sucesso limitado, até então, foi obtido por meio de manipulações genéticas de enzimas específicas de polímeros diretamente

associados à parede celular; reduções substanciais em um dos polímeros resulta tipicamente em fenótipos de crescimento indesejados ou compensação por outros polímeros (His *et al.*, 2001; Pena *et al.*, 2007; Persson *et al.*, 2007; Schillmiller *et al.*, 2009).

Como nesse trabalho podemos evidenciar a redução de glicose presentes na parede celular; esta redução foi mais expressiva quanto maior o silenciamento da *MIPS*; porém a variação não foi significativa ao teste estatístico utilizado.

A celulose não apresentou diferença entre os níveis silenciados de *MIPS* e as plantas-controle, uma diminuição substancial em celulose sugeriria uma dramática redução na síntese parede celular, o que não ocorreu em folhas de plantas silenciadas; demonstrado de maneira consistente pela pouca alteração no conteúdo de açúcares neutros de parede celular. Os ácidos urônicos apresentaram acréscimo de conteúdo no nível com maior silenciamento apresentando apenas 4% de expressão de *MIPS*.

4.5 CONCLUSÕES

Através da avaliação do corpo vegetativo de plantas com diferentes níveis de expressão da *MIPSI* foi possível verificar que o silenciamento parcial dessa enzima não altera o rendimento fotossintético e nem a maquinaria fotossintética, além de não ocasionar danos oxidativos.

Adicionalmente, o silenciamento parcial também não ocasionou diferenças no conteúdo de componentes de parede celular, que poderiam ser influenciados indiretamente pelo conteúdo de *mio*-inositol. No entanto, o conteúdo de açúcares foi influenciado pelo nível de silenciamento, principalmente aqueles estreitamente envolvidos com o metabolismo de *mio*-inositol (e.g., sacarose, glicose e trealose), por serem relacionados a abundância do *mio*-inositol ou seu substrato glicose-6-fosfato.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos demonstram que embora o silenciamento parcial da *mio*-inositol fosfato sintase altere o conteúdo de açúcares essa alteração não promove mudanças em parâmetros relacionados à fotossíntese, sistema antioxidativo e estrutura vegetativa, indicando uma extensiva reprogramação metabólica em resposta ao silenciamento dessa enzima. Ademais, os resultados obtidos abrem novas perspectivas de estudos envolvendo incremento de açúcares e bioenergética em plantas.

4.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfenas-Zerbini P, Maia IG, Fávoro RD, Cascardo JCM, Brommonschenkel SH, Zerbini FM. 2009. Genome-wide analysis of differentially expressed genes during the early stages of tomato infection by a Potyvirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 352–361.

Anderson JM. 1986. Photoregulation of the composition, function and structure of the thylakoid membranes. *Annual Review of Plant Physiology* 37:93-136.

Bailey S, Walters RG, Jansson S, Horton P. 2001. Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta* 213:794-801.

Baroli I, Niyogi KK. 2000. Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 355:1385-1394

Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44:276-287.

Bilger W, Schreiber U, Bock M. 1995. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia* 102:425-432.

Blakeney AB, Harris PJ, Henry RJ, Stone BA. 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research* 113:291–299

Carroll A, Somerville C. 2009. Cellulosic biofuels. *Annual Review of Plant Biology* 60: 165–182.

Chance B, Maehley AC. 1995. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* 2:764-755.

Cheng CL, Acedo GN, Cristinsin M, Conkling MA. 1992. Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89:1861-1874.

CRUZ, C.D. GENES. 2013. A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 35:271-276

Del Longo OT, González A, Pastori GM, Trippi VS. 1993. Antioxidant defenses under hyperxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant, Cell and Physiology* 34:1023-1028.

Demmig-Adams B, Adams WWIII. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1:21-26.

- Dische Z. 1962. General color reactions. *Methods in Carbohydrate Chemistry* 1:478–492
- Douce R, Neuburger M. 1989. The uniqueness of plant mitochondria. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:371-414.
- Doyle JJ, Doyle JL, Hortorium LHB. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Edelman J, Hanson AD. 1971. Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in carrot callus cultures. *Planta* 98:150-156.
- Endres S, Tenhaken R. 2009. Myoinositol oxygenase controls the level of myo-inositol in Arabidopsis, but does not increase ascorbic acid. *Plant Physiology* 149:1042–1049.
- Eskling M, Arvidsson PO, Akerlund HE. 1997. The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiologia Plantarum* 100:806-816
- Fernandes D. 2009. Morfogênese in vitro em tomateiro e berinjela e silenciamento gênico da sintase do mio-inositol-fosfato por rnaí em tomateiro. Dissertação em Fisiologia Vegetal de Magister Scientiae. Universidade Federal de Viçosa. 89 p.
- Fernie AR, Willmitzer L. 2001. Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiology* 127:1459–1465
- Filisetti-Cozzi TMCC, Carpita NC. 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* 197:157-162.
- Flores-Pérez U, Pérez-Gil J, Closa M, Wright LP, Botella-Pavía P, Phillips MA. 2010. Pleiotropic regulatory locus 1 (PRL1) integrates the regulation of sugar responses with isoprenoid metabolism in Arabidopsis. *Molecular Plant* 3:101-112.
- Galili G. 2011. The aspartate-family pathway of plants: linking production of essential amino acids with energy and stress regulation. *Plant Signaling and Behavior* 6:192–195.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990:87-92.
- Giannopolitis CN, Ries SK. 1999. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59:309-314.
- Gibon Y, Usadel B, Blaesing OE, Kamlage B, Hoehne M, Trethewey R, Stitt M. 2006. Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in Arabidopsis rosettes. *Genome Biology* 7:76-74.

- Hanson J, Hanssen M, Wiese A, Hendriks MM, Smeekens S. 2008. The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2. *Plant Journal* 53:935-949
- Havir EA, McHale NA. 1985. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 84:450-455.
- His I, Driouich A, Nicol F, Jauneau A, Hofte H. 2001. Altered pectin composition in primary cell walls of korrgan, a dwarf mutant of Arabidopsis deficient in membrane-bound endo-1,4-beta-glucanase. *Planta* 212:348–358.
- Jin E, Yokthongwattana K, Polle JEW, Melis A. 2003. Role of reversible xanthophyll cycle in the PSII damage and repair cycle in *Dunaliella salina*. *Plant Physiology* 132:352-364
- Kaiser WM, Huber SC. 2001. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *Journal of Experimental Botany* 52:1981- 1989.
- Kar, M., Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57:315-319.
- Karner U, Peterbauer T, Raboy V, Jones DA, Hedley CL, Richter A. 2004. Myo-inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds. *Journal of Experimental Botany* 55:1981–1987.
- Keller R, Brearley CA, Trethewey RN, Muller-Rober B. 1998. Reduced inositol content and altered morphology in transgenic potato plants inhibited for 1D-myo-inositol 3-phosphate synthase. *Plant Journal* 16:403–410
- Klein D, Morcuende R, Stitt M, Krapp A. 2000. Regulation of nitrate reductase expression in leaves by nitrate and nitrogen metabolism is completely overridden when sugars fall below a critical level. *Plant Cell Environment* 23:863-871.
- Klinghammer M, Tenhaken R. 2007. Genome-wide analysis of the UDP-glucose dehydrogenase gene family in Arabidopsis, a key enzyme for matrix polysaccharides in cell walls. *Journal of Experimental Botany* 58:3609–21.
- Klughammer C, Schreiber U. 2008. Complementary PSII quantum yield calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and saturation pulse method. *PAM Application* 1:27-35.
- Koch K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 7:235-246.
- Koshiha, T. 1993. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedling and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant, Cell and Physiology* 34:713-721.

- Kramer, D.M., Johnson, G., Kiirats, O., Edwards, G.E. 2004. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes *Photosynthesis Research* 79:209-218.
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR. 2006. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* 1:387–396.
- Liu J, Stevens C, Khan V, Lu J, Wilson C, Adeyeye O, Kabwe M, Pusey P, Chalutz E, Sultana T. 1993. Application of ultraviolet-C light on storage rots and ripening of tomatoes. *Journal of Food Protection* 56:868–873.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25:402-408.
- Loewus FA, Jang R, Seegmiller CG. 1958. The conversion of C¹⁴-labeled sugars to l-ascorbic acid in ripening strawberries: IV. Comparative study of d-galacturonic acid and l-ascorbic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 232:533-541.
- Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL. 2004. Myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology* 134:1200–1205.
- Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J. 2008. TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* 24:732–737.
- Lunn JE, Feil R, Hendriks JH, Gibon Y, Morcuende R, Osuna D. 2006. Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADP glucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* 397:139-148.
- Lunn JE. 2002. Evolution of sucrose synthesis. *Plant Physiology*. 128: 1490-1500.
- Mackenzie S, McIntosh L. 1999. Higher plant mitochondria. *Plant Cell* 11:571–585
- Majumder AL, Johnson MD, Henry SA. 1997. 1L-myoInositol-1-phosphate synthase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1348:245–25.
- Morcuende R, Krapp A, Hurry V, Stitt M. 1998. Sucrose feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of α -oxoglutarate synthesis, and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves. *Planta* 206:394-409.
- Morita N, Nakazato H, Okuyama H, Kim Y, Thompson GA. 1996. Evidence for a glycosyl inositolphospholipid-anchored alkaline phosphatase in the aquatic plant *Spirodela oligorrhiza*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1290:3–62.
- Müller C. 2011. Resposta fotossintética à toxidez de ferro em diferentes cultivares de arroz. Tese. Tese em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Viçosa, 124 p.
- Nagata T, Hara H, Saitou K, Kobashi A, Kojima K, Yuasa T. 2012. Activation of ADP-Glucose Pyrophosphorylase Gene Promoters by a WRKY Transcription Factor,

- AtWRKY20, in *Arabidopsis thaliana* L. and Sweet Potato (*Ipomoea batatas* Lam.). *Plant Production Science* 15:10-18.
- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. *Plant, Cell and Physiology* 22:867-880.
- Niyogi, K. 1999. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:333-59.
- Nunes A, Vianna G, Cuneo F, Amaya-Farfán J, Capdeville G, Rech E, Aragão F. 2006. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPSI*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta* 224:125-132.
- Ort DR, Baker NR. 2002. A photoprotective role for O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis? *Current Opinion in Plant Biology* 5:193-198
- Oxborough K, Baker NR. 1997. An instrument capable of imaging chlorophyll a fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at the cellular and sub-cellular levels of organisation. *Plant, Cell and Environment* 20:1473-1483.
- Pamplin EJ, Chapman JM. 1975. Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in tissue culture: changes in the activity of the enzymes of the chlorophyll biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany* 26:212.
- Peixoto PHP, Cambraia J, Santanna R, Mosquim PR, Moreira MA. 1999. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 11:137-143.
- Pena MJ, Zhong RQ, Zhou GK, Richardson EA, O'Neil MA, Darvill AG, York WS, Ye ZH. 2007. *Arabidopsis* irregular xylem8 and irregular xylem9: implications for the complexity of glucuronoxylan biosynthesis. *Plant Cell* 19:549-562.
- Pereira EG. 2009. Efeitos tóxicos do ferro: alterações fisiológicas e morfológicas em plantas cultivadas e de restinga. Tese de Doutorado: Universidade Federal de Viçosa. 117 p
- Persson S, Caffall KH, Freshour G, Hilley MT, Bauer S, Poindexter P, Hahn MG, Mohnen D, Somerville C. 2007. The *Arabidopsis* irregular xylem8 mutant is deficient in glucuronoxylan and homogalacturonan, which are essential for secondary cell wall integrity. *Plant Cell* 19:237-255.
- Peterbauer T, Richter A. 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11:185-197.
- Pollock C, Farrar J, Tomos D, Gallagher J, Lu C, Koroleva O. 2003. Balancing supply and demand: the spatial regulation of carbon metabolism in grass and cereal leaves. *Journal of Experimental Botany* 54:489-494.

- Pollock CJ. 1990. The response of plants to temperature change. *Journal of Agricultural Science* 115:1-5.
- Scheibe R, Backhausen JE, Emmerlich V, Holtgreffe S. 2005. Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *Journal of Experimental Botany* 56:1481–1489.
- Scheible WR, Pauly M. 2004. Glucosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Current Opinion in Plant Biology* 7:285–295
- Schilmiller AL, Stout J, Weng JK, Humphreys J, Ruegger MO, Chapple C. 2009. Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, grow than development in Arabidopsis. *Plant Journal* 60:771–782
- Seelan RS, Lakshmanan J, Casanova MF, Parthasarathy RN. 2009. Identification of myo-inositol-3-phosphate synthase isoforms: characterization, expression and putative role of a 16-kDa γ c isoform. *Journal of Biological Chemistry* 284:9443–9457
- Sengupta S, Mukherjee S, Parween S, Majumder AL. 2012. Galactinol synthase across evolutionary diverse taxa: Functional preference for higher plants? *Federation of European Biochemical Societies* 586:1488–1496.
- Sharples SC, Fry SC. 2007. Radioisotope ratios discriminate between competing pathways of cell wall polysaccharide and RNA biosynthesis in living plant cells. *Plant Journal* 52:252–262.
- Sheen J. 1990. Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* 2:1027-1038.
- Siedlecka, A.; Gardestrom, P.; Samuelson, G.; Oquist, G.; Gardestrom, P. 1997. Primary carbon metabolism in *Phaseolus vulgaris* plants under Cd/Fe interaction. *Plant Physiology and Biochemistry* 35:951-957
- Smirnoff N. 2005. Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. In: Smirnoff N. (Ed.) *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Blackwell Publishing Ltd. p. 53-86
- Sulpice R, Pyl ET, Ishihara H, Trenkamp S, Steinfath M, Witucka-Wall H, Gibon Y, Usadel, B, Poree F, Piques MC, VonKorff M, Steinhauser MC, Keurentjes JJ, Guenther M, Hoehne M, Selbig J, Fernie AR, Altmann T, Stitt M. 2009. Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106:10348–10353.
- Thimm O, Blässing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY, Stitt M. 2004. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant Journal* 37: 914–939
- Updegraff DM. 1969. Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Analytical Biochemistry* 32:420–424

Van Oosten JJ, Besford RT. 1994. Sugar feeding mimics effect of acclimation to high CO₂-rapid down regulation of Rubisco small subunit transcripts but not of the large subunit transcripts. *Plant Physiology* 143:306-312

Wilson A, Boulay C, Wilde A, Kerfeld CA, Kirilovsky D. 2007. Light-Induced Energy Dissipation in Iron-Starved Cyanobacteria: Roles of OCP and IsiA Proteins. *The Plant Cell* 19:656-672

Wingler A, Masclaux-Daubresse C, Fischer AM. 2009. Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms. *Journal of Experimental Botany* 60:1063-1066.

Yamori W, Noguchi K, Hikosaka K, Terashima I. 2009. Cold-tolerant crop species have greater temperature homeostasis of leaf respiration and photosynthesis than cold-sensitive species. *Plant Cell Physiology* 50:203-215.

Zhang W, Gruszewski HA, Chevone BI, Nessler CL. 2008. An Arabidopsis purple acid phosphatase with phytase activity increases foliar ascorbate. *Plant Physiology* 146:431-440.

CONCLUSÕES GERAIS

A alta homologia entre os membros da família *MIPSI* nas diferentes espécies possibilitou que a construção tipo *intron-hairpin-RNA* com fragmentos do gene *MIPS* de *Glycine max* sob controle do promotor *CaMV 35S* induzisse o silenciamento no tomateiro.

O silenciamento de *MIPS* em tomateiros promove alterações no desenvolvimento de sementes, germinação e desenvolvimento das plântulas. Essa alteração foram mantidas em linhagens transgênicas T₀ com ploidia alterada (mixoploides e tetraploides) e normais (diploides) bem como na progênie T₁ com padrão normal de ploidia (diploides). Tal alteração parece estar associada ao conteúdo de açúcares de reserva e de fitato em sementes, alterados em plantas silenciadas.

Reduções na expressão de *MIPSI* também ocasionam redução da resistência da epiderme e do pericarpo de frutos. Essa alteração foi comprovada em frutos da linhagem T₁, possivelmente devido à relação do *mio*-inositol com constituintes de parede celular, embora a quantificação de monossacarídeos de parede celular em frutos da linhagem T₂ tenha sido semelhante entre as linhagens silenciadas e as plantas-controle. Adicionalmente, o silenciamento da *MIPSI* promove alterações em vários metabólitos durante o desenvolvimento de frutos e sementes, principalmente em aminoácidos e açúcares. A intensidade da variação do conteúdo de metabólitos é proporcional a proximidade desses com o metabolismo de inositol, nível de silenciamento e também se associam as variações metabólicas normalmente observadas no que respeita a idade e estágio de desenvolvimento dos frutos e sementes.

Em folhas, o silenciamento parcial é capaz de alterar o conteúdo de açúcares, os quais acumulam ou reduzem em resposta ao metabolismo de *mio*-inositol. Ressalta-se o acúmulo de sacarose glicose e frutose e redução de *mio*-inositol e amido. Apesar dessas mudanças, drásticas ou não, a homeostase metabólica parece ser de sobremodo mantida, tendo em vista que os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas, assim como a atividade de enzimas do estresse antioxidativo, apresentam padrão semelhante às plantas-controle.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Tomados em conjunto, os resultados obtidos sugerem que o silenciamento da sintase do *mio*-inositol-fosfato (*MIPSI*) possa ser utilizada no melhoramento vegetal tendo em vista a alteração de importantes compostos envolvidos no metabolismo de *mio*-inositol, além de identificar as diversas vias metabólicas e respostas morfogênicas associados ao *mio*-inositol. Ainda, novas perspectivas de manipulação dos níveis de açúcares com reflexos na composição da parede celular e bioenergética celular são evidentes nesse trabalho. Ademais, estudos em plantas silenciadas quanto a composição da parede celular no que respeita a resistência e quantificação dos componentes, assim como a capacidade de acúmulo de açúcares no corpo vegetativo e reprodutivo, aplicados ao melhoramento vegetal, devem ser foco de estudos futuros, particularmente no que respeita aspectos associados ao florescimento, produtividade e respostas fisiológicas dessas plantas sob condições de estresses bióticos e abióticos.

DADOS SUPLEMENTARES

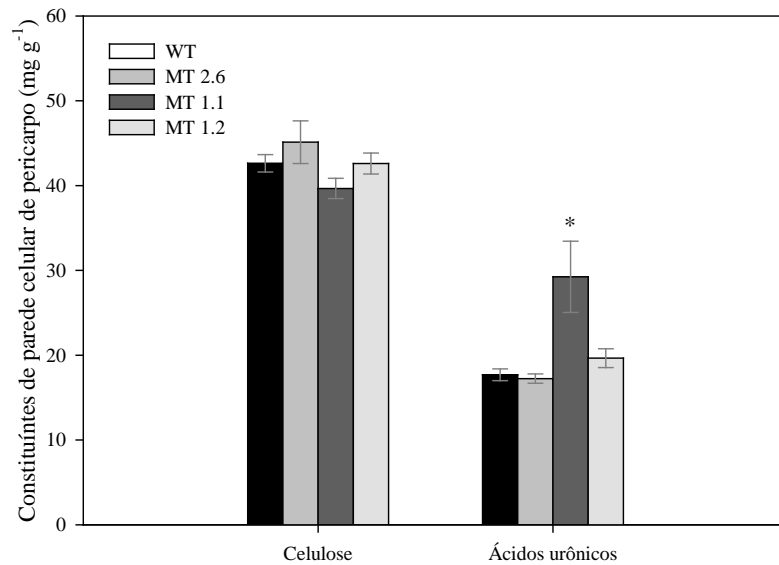


Figura 1. Celulose e ácido urônico de paredes celulares em pericarpo de frutos de 60 dias após a antese de plantas-controle (WT) e níveis de silenciamento da expressão de *MIPS1* na progênie T₂ de tomateiro ‘Moneymaker’. Asterisco indica diferença estatística pelo Teste-*t* ($p < 0,05$) entre a planta controle (WT) e as linhagens silenciadas. Barras indicam erro padrão ($n = 6$).

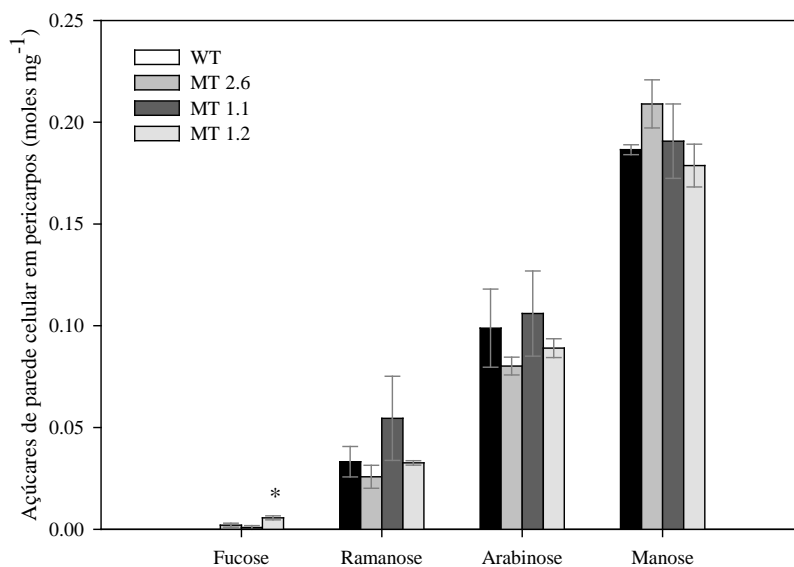


Figura 2. Açúcares de parede celular em pericarpo de frutos de 60 dias após a antese de plantas-controle (WT) e níveis de silenciamento da expressão de *MIPS1* na progênie T₂ de tomateiro ‘Moneymaker’. Asterisco indica diferença estatística pelo Teste-*t* ($p < 0,05$) entre a planta controle (WT) e as linhagens silenciadas. Barras indicam erro padrão ($n = 6$).

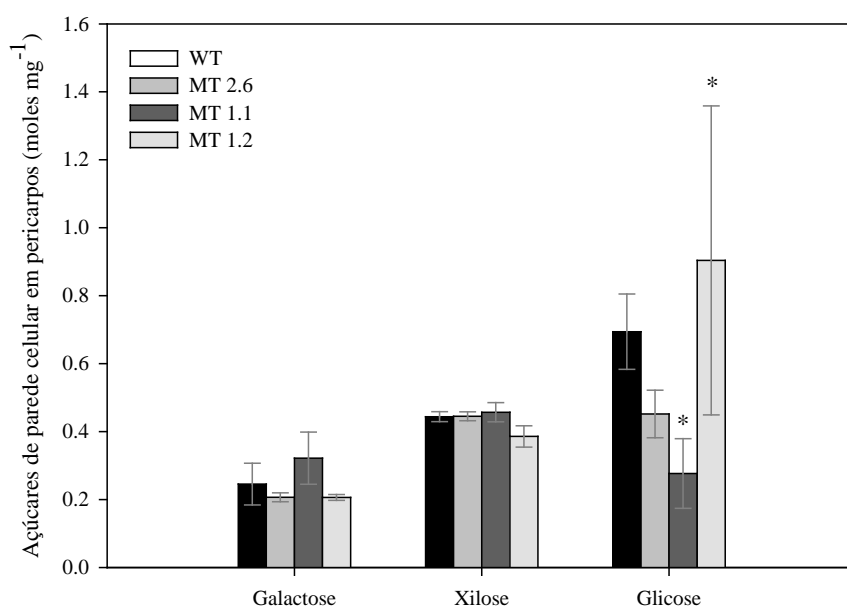


Figura 3. Açúcares de parede celular em pericarpo de frutos de 60 dias após a antese de plantas-controlre (WT) e níveis de silenciamento da expressão de *MIPS1* na progênie T₂ de tomateiro ‘Moneymaker’. Asterisco indica diferença estatística pelo Teste-*t* ($p < 0,05$) entre a planta controle (WT) e as linhagens silenciadas. Barras indicam erro padrão ($n = 6$).

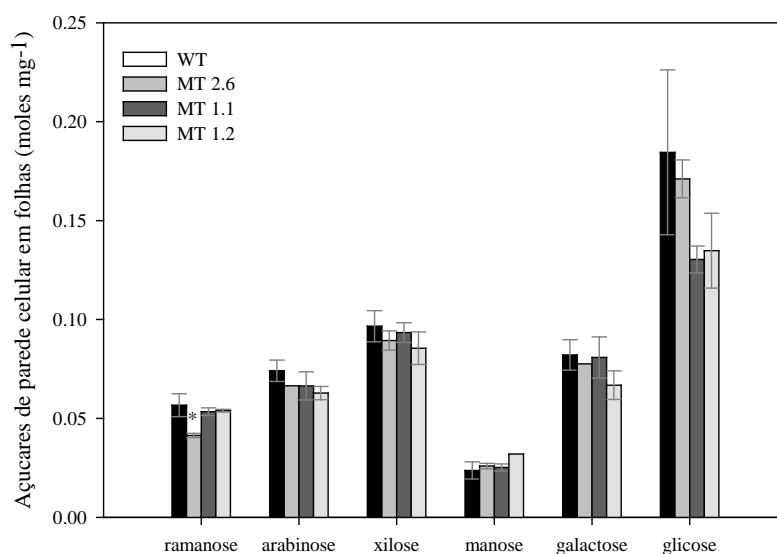


Figura 4. Quantificação de açúcares de parede celular em folhas de plantas-controlre (WT) e níveis de silenciamento da expressão de *MIPS1* na progênie T₂ de tomateiro ‘Moneymaker’. Asterisco indica diferença estatística pelo Teste-*t* ($p < 0,05$) entre a planta controle (WT) e as linhagens silenciadas. Barras indicam erro padrão ($n = 6$).

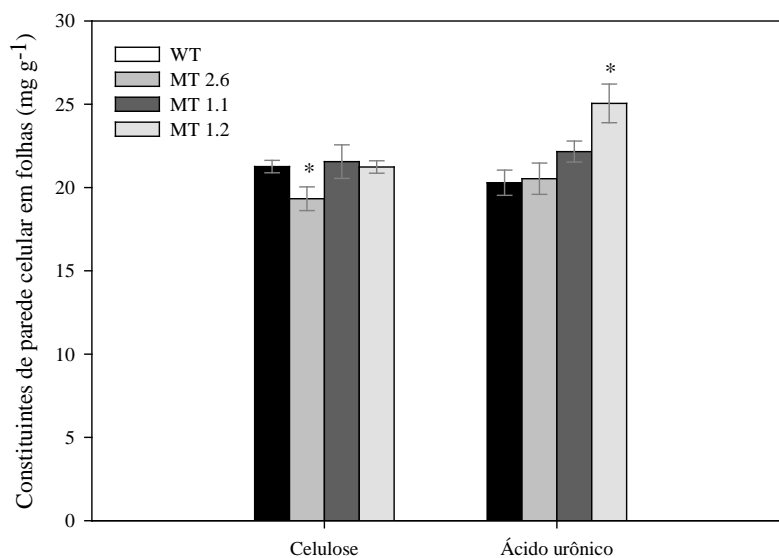


Figura 5. Quantificação de celulose e ácido urônico em folhas de plantas-controle (WT) e níveis de silenciamento da expressão de *MIPS1* na progênie T₂ de tomateiro 'MoneyMaker'. Asterisco indica diferença estatística pelo Teste-*t* ($p < 0,05$) entre a planta controle (WT) e as linhagens silenciadas. Barras indicam erro padrão ($n = 6$).

Tabela 1. Efeito do silenciamento na expressão de *MPIS1* no perfil metabólico em pericarpos de frutos contendo 10 dias após a antese. Metabólitos foram identificados em plantas-controle (WT) e plantas apresentando seis níveis de silenciamento da expressão de *MPIS1*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à média das plantas WT e apresentados pela média dos valores absolutos. SE = erro padrão (n = 6).

Pericarpo 10 DAA	WT	SE	MT 8.25	SE	MT 2.6	SE	MT 7.13	SE	MT 1.1	SE	MT 7.2	SE	MT 1.2	SE
<i>Aminoácidos</i>														
Asparagina	1.00	± 0.30	0.34	± 0.04	0.52	± 0.15	3.32	± 1.33	0.50	± 0.05	0.52	± 0.52	0.30	± 0.11
Ácido aspártico	1.00	± 0.31	0.68	± 0.09	0.84	± 0.18	3.17	± 0.85	1.18	± 0.11	0.85	± 0.85	0.89	± 0.19
Beta-alanina	1.00	± 0.30	1.01	± 0.14	1.28	± 0.21	1.77	± 0.41	0.88	± 0.19	0.49	± 0.49	0.88	± 0.04
Isoleucina	1.00	± 0.18	0.26	± 0.04	0.55	± 0.09	0.69	± 0.29	0.63	± 0.11	0.21	± 0.21	0.26	± 0.08
Glutamina	1.00	± 0.21	0.46	± 0.05	1.37	± 0.20	3.46	± 0.95	1.46	± 0.19	0.84	± 0.84	0.71	± 0.14
Glicina	1.00	± 0.21	0.31	± 0.04	0.37	± 0.07	0.68	± 0.17	0.48	± 0.03	0.29	± 0.29	0.39	± 0.13
Metionina	1.00	± 0.36	0.47	± 0.03	0.76	± 0.14	1.71	± 0.56	1.03	± 0.21	0.53	± 0.53	0.50	± 0.12
Fenilalanina	1.00	± 0.39	0.41	± 0.05	1.30	± 0.29	0.76	± 0.11	1.14	± 0.27	0.34	± 0.34	0.68	± 0.13
Serina	1.00	± 0.45	0.62	± 0.08	1.67	± 0.31	3.13	± 0.72	1.20	± 0.08	0.80	± 0.80	0.88	± 0.18
Treonina	1.00	± 0.34	0.52	± 0.08	1.02	± 0.30	2.66	± 0.79	1.11	± 0.15	0.48	± 0.48	0.42	± 0.07
Valina	1.00	± 0.36	0.90	± 0.13	1.55	± 0.21	2.82	± 0.75	2.15	± 0.45	0.69	± 0.69	1.19	± 0.31
<i>Ácidos orgânicos</i>														
Ácido benzóico	1.00	± 0.08	1.10	± 0.06	1.13	± 0.12	1.06	± 0.09	0.95	± 0.04	1.00	± 1.00	1.32	± 0.12
GABA	1.00	± 0.21	1.50	± 0.30	0.98	± 0.19	1.33	± 0.24	1.03	± 0.25	0.51	± 0.51	1.29	± 0.33
Deidroascorbato	1.00	± 0.03	0.75	± 0.04	1.01	± 0.09	0.89	± 0.02	0.73	± 0.06	0.98	± 0.98	0.68	± 0.06
Ácido galacturônico	1.00	± 0.12	1.35	± 0.12	1.73	± 0.23	1.66	± 0.17	1.07	± 0.21	0.45	± 0.45	1.50	± 0.11
Ácido glutâmico	1.00	± 0.26	0.71	± 0.05	1.31	± 0.29	2.41	± 0.59	1.82	± 0.28	0.86	± 0.86	1.03	± 0.11
Ácido glutárico	1.00	± 0.47	1.04	± 0.06	1.37	± 0.24	3.18	± 1.11	5.11	± 0.63	1.53	± 1.53	2.03	± 0.37
Ácido glicérico	1.00	± 0.08	0.92	± 0.09	0.79	± 0.10	1.03	± 0.14	1.03	± 0.13	1.09	± 1.09	0.87	± 0.20
Ácido láctico	1.00	± 0.14	0.80	± 0.11	0.89	± 0.05	0.81	± 0.12	1.20	± 0.13	0.64	± 0.64	0.97	± 0.13
Ácido nicotínico	1.00	± 0.12	1.36	± 0.08	1.63	± 0.10	1.91	± 0.09	2.13	± 0.18	2.06	± 2.06	2.45	± 0.24
Ácido fosfórico	1.00	± 0.13	0.86	± 0.07	1.15	± 0.05	1.21	± 0.11	0.83	± 0.06	0.95	± 0.95	1.05	± 0.05
Ácido piroglutâmico	1.00	± 0.30	0.77	± 0.06	1.57	± 0.34	4.39	± 1.24	1.70	± 0.24	1.11	± 1.11	0.91	± 0.23
Ácido quinico	1.00	± 0.18	1.03	± 0.12	2.32	± 0.37	3.73	± 1.46	1.59	± 0.52	1.01	± 1.01	1.89	± 0.33

Ácido treônico	1.00	±	0.09	1.07	±	0.02	1.04	±	0.12	1.26	±	0.11	1.42	±	0.10	0.95	±	0.95	1.35	±	0.11
Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)																					
Fumarato	1.00	±	0.04	0.84	±	0.02	0.88	±	0.06	0.97	±	0.13	0.84	±	0.08	0.89	±	0.89	0.81	±	0.09
Malato	1.00	±	0.11	0.77	±	0.05	1.26	±	0.18	1.54	±	0.31	0.66	±	0.04	0.98	±	0.98	1.06	±	0.07
Piruvato	1.00	±	0.15	0.66	±	0.07	0.57	±	0.09	1.07	±	0.13	0.78	±	0.12	0.67	±	0.67	0.67	±	0.11
Açúcares																					
Maltose	1.00	±	0.15	0.88	±	0.07	1.20	±	0.10	1.08	±	0.16	0.89	±	0.19	1.39	±	1.39	1.29	±	0.07
Rafinose	1.00		0.14	1.00		0.05	4.35		1.35	2.21		0.61	1.11		0.03	2.19		2.19	1.54		0.12
Sacarose	1.00	±	0.06	1.17	±	0.10	1.24	±	0.19	1.40	±	0.18	1.63	±	0.06	1.41	±	1.41	1.41	±	0.09
Xilose	1.00	±	0.10	1.23	±	0.06	1.21	±	0.15	0.88	±	0.06	0.91	±	0.11	1.45	±	1.45	1.26	±	0.09
Açúcares alcóois																					
Galactinol	1.00	±	0.10	1.00	±	0.03	2.64	±	1.05	1.70	±	0.26	1.58	±	0.34	3.07	±	3.07	1.00	±	0.13
Glicerol	1.00	±	0.08	0.93	±	0.10	0.93	±	0.07	0.90	±	0.04	1.22	±	0.11	0.93	±	0.93	1.09	±	0.05
Gliceraldeído-3-fosfato	1.00	±	0.18	0.90	±	0.08	1.20	±	0.09	1.60	±	0.28	1.22	±	0.06	1.13	±	1.13	1.32	±	0.11
Lactitol	1.00	±	0.11	1.01	±	0.05	1.26	±	0.12	1.06	±	0.04	1.18	±	0.12	1.39	±	1.39	1.58	±	0.08
<i>mio</i> -inositol	1.00	±	0.08	0.96	±	0.07	1.22	±	0.07	1.13	±	0.11	0.96	±	0.11	0.81	±	0.81	1.03	±	0.09

Tabela 2. Efeito do silenciamento na expressão de *MPIS1* no perfil metabólico em pericarpos de frutos contendo 25 dias após a antese. Metabólitos foram identificados em plantas-controle (WT) e plantas apresentando seis níveis de silenciamento da expressão de *MIPSI*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à média das plantas WT e apresentados pela média dos valores absolutos. SE = erro padrão (n = 6).

Pericarpo 25 DAA	WT	SE	MT 8.25	SE	MT 2.6	SE	MT 7.13	SE	MT 1.1	SE	MT 7.2	SE	MT 1.2	SE							
Aminoácidos																					
Asparagina	1.00	±	0.22	0.52	±	0.10	0.58	±	0.13	0.85	±	0.22	0.51	±	0.09	0.85	±	0.17	1.19	±	0.18
Ácido aspártico	1.00	±	0.09	0.85	±	0.06	0.84	±	0.04	0.98	±	0.11	0.77	±	0.04	1.12	±	0.08	0.97	±	0.05
Beta-alanina	1.00	±	0.16	0.79	±	0.13	0.74	±	0.14	1.06	±	0.16	0.55	±	0.07	1.21	±	0.18	1.15	±	0.12
Glutamina	1.00	±	0.15	0.50	±	0.08	0.71	±	0.21	1.09	±	0.28	0.53	±	0.09	1.28	±	0.27	0.89	±	0.07
Glicina	1.00	±	0.10	0.95	±	0.21	1.09	±	0.30	1.11	±	0.20	0.49	±	0.05	1.50	±	0.26	0.85	±	0.10
Isoleucina	1.00	±	0.14	0.79	±	0.15	0.80	±	0.17	0.99	±	0.19	0.54	±	0.08	1.18	±	0.21	0.74	±	0.05
Lisina	1.00	±	0.18	0.62	±	0.14	0.55	±	0.13	1.00	±	0.27	0.44	±	0.06	1.37	±	0.24	0.52	±	0.06

Ornitina	1.00	±	0.17	0.89	±	0.19	0.69	±	0.15	1.18	±	0.28	0.55	±	0.08	1.29	±	0.22	0.42	±	0.10
Prolina	1.00	±	0.12	0.54	±	0.11	0.54	±	0.12	0.94	±	0.15	0.30	±	0.05	0.80	±	0.18	0.38	±	0.05
Serina	1.00	±	0.14	0.80	±	0.13	0.86	±	0.13	1.13	±	0.21	0.55	±	0.03	1.25	±	0.20	0.78	±	0.08
Treonina	1.00	±	0.14	0.92	±	0.18	0.83	±	0.16	1.07	±	0.18	0.60	±	0.09	1.41	±	0.26	0.90	±	0.07
Tirosina	1.00	±	0.10	0.48	±	0.11	0.81	±	0.17	0.96	±	0.21	0.32	±	0.03	0.94	±	0.15	0.82	±	0.07
Valina	1.00	±	0.15	0.87	±	0.22	0.94	±	0.23	1.03	±	0.17	0.74	±	0.20	1.41	±	0.37	0.98	±	0.05
<i>Ácidos orgânicos</i>																					
GABA	1.00	±	0.13	0.60	±	0.04	0.63	±	0.05	0.78	±	0.11	0.64	±	0.06	0.79	±	0.13	1.02	±	0.12
Deidroascorbato	1.00	±	0.07	1.25	±	0.05	1.33	±	0.11	1.01	±	0.10	1.37	±	0.12	1.04	±	0.10	1.49	±	0.16
Ácido glutâmico	1.00	±	0.06	1.00	±	0.10	0.83	±	0.07	0.94	±	0.12	0.72	±	0.05	1.29	±	0.15	0.79	±	0.05
Ácido láctico	1.00	±	0.15	1.42	±	0.20	1.16	±	0.26	0.90	±	0.28	4.37	±	0.98	7.75	±	2.04	7.19	±	0.96
Ácido nicotínico	1.00	±	0.10	1.08	±	0.12	1.02	±	0.03	1.02	±	0.08	1.03	±	0.05	1.47	±	0.15	1.26	±	0.03
Ácido piroglutâmico	1.00	±	0.17	0.63	±	0.11	0.65	±	0.16	0.89	±	0.21	0.45	±	0.06	1.03	±	0.20	0.61	±	0.04
Ácido quinico	1.00	±	0.15	2.47	±	0.18	1.05	±	0.15	1.14	±	0.20	2.07	±	0.53	2.36	±	0.10	0.86	±	0.09
<i>Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)</i>																					
Ácido fumárico	1.00	±	0.12	1.12	±	0.08	1.49	±	0.21	1.37	±	0.20	0.77	±	0.06	1.14	±	0.17	1.02	±	0.16
Ácido málico	1.00	±	0.04	1.29	±	0.10	0.93	±	0.09	0.85	±	0.05	1.09	±	0.15	0.97	±	0.06	0.77	±	0.07
<i>Açúcares</i>																					
Glicose	1.00	±	0.07	1.13	±	0.05	1.07	±	0.04	0.96	±	0.03	1.10	±	0.02	1.13	±	0.07	1.33	±	0.01
Maltose	1.00	±	0.09	1.18	±	0.07	1.24	±	0.04	1.03	±	0.09	1.09	±	0.07	1.22	±	0.13	1.29	±	0.05
Manose	1.00	±	0.01	0.99	±	0.03	0.95	±	0.01	0.91	±	0.02	0.91	±	0.03	0.34	±	0.21	1.12	±	0.00
Rafinose	1.00	±	0.12	2.17	±	0.38	1.51	±	0.04	1.61	±	0.33	1.65	±	0.21	1.29	±	0.09	1.64	±	0.17
Sacarose	1.00	±	0.04	1.12	±	0.04	0.86	±	0.09	1.04	±	0.07	0.89	±	0.06	1.37	±	0.03	0.93	±	0.09
Xilose	1.00	±	0.01	1.65	±	0.09	1.56	±	0.15	1.18	±	0.07	1.62	±	0.13	1.43	±	0.21	1.47	±	0.04
<i>Açúcares álcoois</i>																					
Glicerol	1.00	±	0.04	1.16	±	0.07	0.98	±	0.08	0.97	±	0.08	1.11	±	0.09	1.53	±	0.08	1.29	±	0.13
<i>mio</i> -inositol	1.00	±	0.04	0.99	±	0.01	1.11	±	0.09	1.02	±	0.05	0.98	±	0.03	1.03	±	0.08	0.92	±	0.01

Tabela 3. Efeito do silenciamento na expressão de *MPIS1* no perfil metabólico em pericarpos de frutos contendo 50 dias após a antese. Metabólitos foram identificados em plantas-controle (WT) e plantas apresentando seis níveis de silenciamento da expressão de *MPIS1*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à média das plantas WT e apresentados pela média dos valores absolutos. SE = erro padrão (n = 6).

Pericarpo 50 DAA	WT	SE	MT 8.25	SE	MT 2.6	SE	MT 7.13	SE	MT 1.1	SE	MT 7.2	SE	MT 1.2	SE
<i>Aminoácidos</i>														
Asparagina	1.00	± 0.16	0.70	± 0.14	0.82	± 0.21	0.85	± 0.26	1.53	± 0.26	0.67	± 0.16	0.99	± 0.14
Ácido aspártico	1.00	± 0.03	0.81	± 0.11	0.86	± 0.09	1.15	± 0.21	1.29	± 0.10	0.96	± 0.03	1.13	± 0.10
Beta-alanina	1.00	± 0.30	0.82	± 0.15	0.94	± 0.25	0.77	± 0.14	1.45	± 0.24	0.96	± 0.16	1.62	± 0.14
Glutamina	1.00	± 0.21	0.84	± 0.11	1.18	± 0.24	2.08	± 0.21	3.03	± 0.50	1.43	± 0.23	2.21	± 0.47
Glicina	1.00	± 0.11	0.84	± 0.12	1.09	± 0.18	1.07	± 0.15	1.27	± 0.05	0.94	± 0.08	1.39	± 0.14
Isoleucina	1.00	± 0.06	0.79	± 0.13	0.99	± 0.20	0.97	± 0.21	1.11	± 0.12	0.81	± 0.07	1.05	± 0.08
Metionina	1.00	± 0.14	0.75	± 0.14	0.86	± 0.16	1.08	± 0.30	1.51	± 0.17	0.82	± 0.14	1.11	± 0.20
Fenilalanina	1.00	± 0.06	0.68	± 0.09	0.76	± 0.11	0.90	± 0.17	1.07	± 0.03	0.84	± 0.06	1.06	± 0.17
Serina	1.00	± 0.09	0.90	± 0.19	1.02	± 0.17	1.61	± 0.27	1.21	± 0.15	1.16	± 0.09	1.45	± 0.22
Treonina	1.00	± 0.02	0.86	± 0.12	0.99	± 0.16	1.13	± 0.22	1.19	± 0.11	0.96	± 0.06	1.34	± 0.10
Valina	1.00	± 0.09	0.82	± 0.10	0.91	± 0.17	0.86	± 0.12	1.09	± 0.10	0.80	± 0.08	1.04	± 0.10
<i>Ácidos orgânicos</i>														
GABA	1.00	± 0.17	0.77	± 0.10	0.81	± 0.19	0.65	± 0.16	1.21	± 0.08	0.91	± 0.11	1.10	± 0.05
Deidroascorbato	1.00	± 0.06	1.09	± 0.07	1.10	± 0.12	1.28	± 0.08	1.10	± 0.06	1.15	± 0.09	1.18	± 0.12
Ácido glicérico	1.00	± 0.64	0.97	± 0.63	2.15	± 0.44	1.77	± 0.58	2.39	± 0.20	2.55	± 0.27	2.95	± 0.18
Ácido glutâmico	1.00	± 0.09	0.93	± 0.09	0.89	± 0.08	0.97	± 0.13	1.18	± 0.15	0.98	± 0.02	1.24	± 0.06
Ácido láctico	1.00	± 0.19	1.37	± 0.19	0.84	± 0.23	0.70	± 0.09	0.82	± 0.17	0.94	± 0.06	0.58	± 0.06
Ácido nicotínico	1.00	± 0.10	1.00	± 0.05	1.19	± 0.09	1.27	± 0.09	1.55	± 0.09	1.49	± 0.08	2.55	± 0.15
Ácido fosfórico	1.00	± 0.03	0.89	± 0.04	0.83	± 0.06	0.89	± 0.06	1.00	± 0.03	0.90	± 0.03	0.89	± 0.03
Ácido piroglutâmico	1.00	± 0.13	0.72	± 0.09	0.79	± 0.14	0.94	± 0.20	1.39	± 0.20	0.74	± 0.09	1.00	± 0.16
Ácido quinico	1.00	± 0.26	0.77	± 0.13	1.19	± 0.19	1.48	± 0.40	0.82	± 0.09	1.01	± 0.16	1.04	± 0.36
<i>Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)</i>														
Ácido fumárico	1.00	± 0.06	1.13	± 0.07	1.17	± 0.07	1.17	± 0.11	0.99	± 0.07	1.21	± 0.12	1.44	± 0.04
Ácido málico	1.00	± 0.05	0.98	± 0.12	0.97	± 0.09	1.20	± 0.18	1.29	± 0.13	1.10	± 0.12	1.09	± 0.12
Ácido pirúvico	1.00	± 0.08	1.47	± 0.28	1.10	± 0.14	1.71	± 0.34	1.28	± 0.19	0.99	± 0.17	1.07	± 0.10

<i>Açúcares</i>																					
Maltose	1.00	±	0.10	1.24	±	0.15	1.66	±	0.28	1.89	±	0.23	1.11	±	0.14	1.85	±	0.25	1.77	±	0.03
Rafinose	1.00	±	0.27	1.56	±	0.26	1.81	±	0.46	2.46	±	0.89	1.20	±	0.57	1.13	±	0.13	0.64	±	0.21
Sacarose	1.00	±	0.05	1.00	±	0.05	0.92	±	0.01	0.81	±	0.07	0.66	±	0.05	0.82	±	0.04	0.77	±	0.09
Trealose	1.00	±	0.17	1.17	±	0.15	1.38	±	0.24	1.46	±	0.15	1.31	±	0.12	1.42	±	0.10	1.36	±	0.15
Xilose	1.00	±	0.07	1.19	±	0.10	1.16	±	0.02	1.25	±	0.06	0.94	±	0.05	1.09	±	0.05	1.11	±	0.07
<i>Açúcares álcoois</i>																					
Galactinol	1.00	±	0.08	1.02	±	0.13	1.75	±	0.26	1.98	±	0.48	1.06	±	0.04	1.17	±	0.17	1.60	±	0.11
Glicerol	1.00	±	0.08	1.20	±	0.32	1.94	±	0.14	1.28	±	0.25	1.82	±	0.12	1.83	±	0.23	1.42	±	0.18
<i>mio</i> -inositol	1.00	±	0.07	0.95	±	0.08	0.84	±	0.05	1.00	±	0.14	1.11	±	0.08	1.02	±	0.08	0.88	±	0.06

Tabela 4. Efeito do silenciamento na expressão de *MPIS1* no perfil metabólico em pericarpos de frutos contendo 60 dias após a antese. Metabólitos foram identificados em plantas-controle (WT) e plantas apresentando seis níveis de silenciamento da expressão de *MPIS1*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à média das plantas WT e apresentados pela média dos valores absolutos. SE = erro padrão (n = 6).

Pericarpo 60 DAA	WT	SE	MT 8.25	SE	MT 2.6	SE	MT 7.13	SE	MT 1.1	SE	MT 7.2	SE	MT 1.2	SE							
<i>Aminoácidos</i>																					
Asparagina	1.00	±	0.26	0.95	±	0.28	0.65	±	0.24	1.03	±	0.17	1.99	±	0.31	0.22	±	0.08	1.46	±	0.53
Ácido aspártico	1.00	±	0.22	1.00	±	0.17	0.66	±	0.09	0.90	±	0.09	1.57	±	0.26	0.66	±	0.10	1.01	±	0.23
Beta-alanina	1.00	±	0.22	1.70	±	0.34	0.55	±	0.14	1.35	±	0.29	1.92	±	0.35	0.52	±	0.16	3.23	±	0.53
Guanidina	1.00	±	0.68	0.25	±	0.25	0.00	±	0.00	0.15	±	0.15	0.52	±	0.33	4.17	±	1.81	1.43	±	1.22
Glicina	1.00	±	0.09	2.26	±	0.16	1.60	±	0.52	1.60	±	0.40	3.70	±	0.26	0.60	±	0.12	2.76	±	0.49
Glutamina	1.00	±	0.20	1.52	±	0.32	1.22	±	0.41	2.46	±	0.17	4.71	±	0.87	0.83	±	0.29	2.50	±	0.67
Isoleucina	1.00	±	0.12	1.33	±	0.26	1.17	±	0.38	1.32	±	0.25	2.41	±	0.36	0.49	±	0.05	1.81	±	0.42
Metionina	1.00	±	0.25	1.37	±	0.31	0.73	±	0.19	0.95	±	0.17	1.85	±	0.47	0.40	±	0.09	1.93	±	0.41
Fenilalanina	1.00	±	0.26	2.34	±	0.27	1.33	±	0.43	1.55	±	0.30	3.49	±	0.63	0.59	±	0.04	3.88	±	1.38
Prolina	1.00	±	0.22	1.30	±	0.26	0.58	±	0.07	0.86	±	0.11	2.02	±	0.40	1.18	±	0.21	0.95	±	0.09
Serina	1.00	±	0.07	1.23	±	0.25	1.17	±	0.33	1.18	±	0.21	1.85	±	0.26	0.50	±	0.13	1.99	±	0.28

Treonina	1.00	± 0.11	1.25	± 0.24	1.03	± 0.30	1.15	± 0.18	1.96	± 0.26	0.50	± 0.09	1.70	± 0.40
Tirosina	1.00	± 0.24	1.32	± 0.22	1.16	± 0.30	1.18	± 0.18	2.09	± 0.54	0.67	± 0.02	1.17	± 0.19
Valina	1.00	± 0.22	1.98	± 0.34	1.43	± 0.52	1.32	± 0.32	2.75	± 0.35	0.41	± 0.07	2.67	± 0.44
Ácidos orgânicos														
Ácido ascórbico	1.00	± 0.13	1.25	± 0.25	2.01	± 0.32	1.40	± 0.30	0.76	± 0.33	2.70	± 0.13	1.62	± 0.26
GABA	1.00	± 0.13	1.29	± 0.28	0.32	± 0.06	0.99	± 0.18	1.67	± 0.28	0.28	± 0.09	1.67	± 0.39
Deidroascorbato	1.00	± 0.20	1.33	± 0.11	1.43	± 0.09	1.23	± 0.04	1.29	± 0.17	1.44	± 0.07	1.15	± 0.07
Ácido galacturônico	1.00	± 0.16	1.34	± 0.31	1.26	± 0.28	1.26	± 0.18	1.80	± 0.32	1.64	± 0.15	0.69	± 0.12
Ácido glucurônico	1.00	± 0.25	1.66	± 0.41	1.78	± 0.43	1.45	± 0.24	2.14	± 0.46	1.98	± 0.20	0.79	± 0.15
Ácido glutâmico	1.00	± 0.22	0.85	± 0.18	0.52	± 0.11	0.72	± 0.12	1.25	± 0.23	0.50	± 0.09	0.86	± 0.23
Ácido glicérico	1.00	± 0.08	0.96	± 0.05	1.08	± 0.12	0.94	± 0.09	0.98	± 0.06	1.02	± 0.04	1.54	± 0.14
Ácido nicotínico	1.00	± 0.14	0.85	± 0.06	0.90	± 0.03	0.97	± 0.03	1.30	± 0.07	0.96	± 0.07	1.17	± 0.04
Piroglutamato	1.00	± 0.19	1.17	± 0.21	0.76	± 0.22	1.15	± 0.17	1.94	± 0.15	0.55	± 0.13	0.89	± 0.16
Ácido fosfórico	1.00	± 0.05	0.88	± 0.05	0.89	± 0.03	0.93	± 0.02	1.02	± 0.08	0.87	± 0.08	1.05	± 0.03
Ácido quinico	1.00	± 0.13	0.69	± 0.22	1.01	± 0.20	1.32	± 0.15	0.68	± 0.22	0.88	± 0.14	0.57	± 0.09
Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)														
Ácido fumárico	1.00	± 0.27	0.44	± 0.11	0.87	± 0.31	0.42	± 0.02	0.73	± 0.24	0.52	± 0.08	0.78	± 0.18
Ácido málico	1.00	± 0.03	0.76	± 0.12	0.77	± 0.06	0.83	± 0.07	0.66	± 0.15	0.64	± 0.05	0.96	± 0.10
Ácido pirúvico	1.00	± 0.09	0.76	± 0.07	0.81	± 0.04	0.80	± 0.04	0.82	± 0.08	0.86	± 0.06	0.88	± 0.05
Açúcares														
Frutose	1.00	± 0.04	0.93	± 0.02	0.96	± 0.01	0.98	± 0.01	0.95	± 0.03	0.95	± 0.01	0.96	± 0.03
Isomaltose	1.00	± 0.17	1.83	± 0.52	1.49	± 0.45	1.17	± 0.20	1.91	± 0.33	3.11	± 0.91	1.42	± 0.32
Maltose	1.00	± 0.11	0.99	± 0.08	1.25	± 0.12	1.15	± 0.16	0.56	± 0.13	1.18	± 0.20	1.32	± 0.27
Rafinose	1.00	± 0.09	0.63	± 0.11	0.72	± 0.23	1.09	± 0.23	0.81	± 0.31	1.62	± 0.30	0.41	± 0.10
Ramanose	1.00	± 0.20	1.35	± 0.15	1.58	± 0.10	1.70	± 0.08	1.85	± 0.19	1.66	± 0.21	1.47	± 0.12
Sacarose	1.00	± 0.14	0.75	± 0.09	0.62	± 0.04	0.80	± 0.08	0.79	± 0.08	1.16	± 0.03	0.77	± 0.07
Trealose	1.00	± 0.09	0.98	± 0.07	1.27	± 0.14	1.22	± 0.17	0.75	± 0.12	1.19	± 0.18	1.37	± 0.22
Xilose	1.00	± 0.05	1.15	± 0.10	1.33	± 0.07	1.31	± 0.04	1.17	± 0.10	1.41	± 0.07	1.05	± 0.03
Açúcares álcoois														

Glicerol	1.00	±	0.07	0.95	±	0.09	1.05	±	0.06	0.99	±	0.06	1.21	±	0.09	0.99	±	0.09	0.92	±	0.09
Glicerol-3-fosfato	1.00	±	0.23	1.12	±	0.13	0.97	±	0.07	1.17	±	0.09	1.50	±	0.16	1.07	±	0.22	1.28	±	0.14
Galactinol	1.00	±	0.07	0.95	±	0.25	1.33	±	0.10	1.08	±	0.13	1.00	±	0.13	2.45	±	0.24	0.95	±	0.12
<i>mio</i> -inositol	1.00	±	0.10	1.24	±	0.14	1.14	±	0.02	1.15	±	0.03	1.19	±	0.25	1.06	±	0.07	1.39	±	0.10

Tabela 5. Efeito do silenciamento na expressão de *MPIS1* no perfil metabólico em sementes de frutos contendo 10 dias após a antese. Metabólitos foram identificados em plantas-controle (WT) e plantas apresentando seis níveis de silenciamento da expressão de *MPIS1*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à média das plantas WT e apresentados pela média dos valores absolutos. SE = erro padrão (n = 6).

Sementes 10 DAA	WT	SE	MT 8.25	SE	MT 2.6	SE	MT 7.13	SE	MT 1.1	SE	MT 7.2	SE	MT 1.2	SE							
<i>Aminoácidos</i>		±																			
Asparagina	1.00	±	0.26	0.07	±	0.02	0.11	±	0.04	0.30	±	0.09	0.23	±	0.06	0.08	±	0.03	0.17	±	0.11
Ácido aspártico	1.00	±	0.23	0.19	±	0.03	0.24	±	0.08	0.36	±	0.09	0.37	±	0.04	0.22	±	0.05	0.22	±	0.08
Beta-alanina	1.00	±	0.35	0.38	±	0.05	0.26	±	0.04	0.37	±	0.12	0.51	±	0.12	0.17	±	0.04	0.24	±	0.08
Glutamina	1.00	±	0.42	0.30	±	0.07	0.35	±	0.14	1.11	±	0.24	1.23	±	0.22	0.39	±	0.13	0.23	±	0.05
Glicina	1.00	±	0.22	0.24	±	0.02	0.30	±	0.06	0.50	±	0.15	1.13	±	0.30	0.43	±	0.11	0.44	±	0.14
Lisina	1.00	±	0.20	0.09	±	0.02	0.17	±	0.05	0.44	±	0.16	0.38	±	0.07	0.17	±	0.03	0.07	±	0.01
Fenilalanina	1.00	±	0.24	0.15	±	0.03	0.23	±	0.03	0.25	±	0.09	0.29	±	0.06	0.09	±	0.01	0.11	±	0.02
Serina	1.00	±	0.18	0.16	±	0.02	0.42	±	0.12	0.49	±	0.15	0.56	±	0.11	0.49	±	0.16	0.39	±	0.08
Treonina	1.00	±	0.26	0.16	±	0.03	0.08	±	0.01	0.21	±	0.07	0.53	±	0.05	0.13	±	0.03	0.18	±	0.08
Tiramina	1.00	±	0.71	0.21	±	0.02	0.84	±	0.10	0.76	±	0.17	0.89	±	0.10	2.11	±	0.50	0.67	±	0.15
Tirosina	1.00	±	0.36	0.19	±	0.03	0.24	±	0.05	0.64	±	0.19	0.51	±	0.10	0.16	±	0.02	0.11	±	0.02
Valina	1.00	±	0.36	0.80	±	0.19	0.78	±	0.18	1.09	±	0.30	2.29	±	0.43	0.47	±	0.07	0.49	±	0.12
<i>Ácidos orgânicos</i>																					
Ácido glutâmico	1.00	±	0.11	0.35	±	0.06	0.39	±	0.09	0.68	±	0.16	0.56	±	0.11	0.34	±	0.05	0.32	±	0.04
Ácido fosfórico	1.00	±	0.11	0.97	±	0.03	0.99	±	0.05	0.95	±	0.02	0.68	±	0.09	0.94	±	0.06	0.80	±	0.06
Ácido piroglutâmico	1.00	±	0.22	0.17	±	0.04	0.18	±	0.07	0.41	±	0.10	0.52	±	0.07	0.15	±	0.05	0.10	±	0.02
Ácido quinico	1.00	±	0.59	0.50	±	0.17	3.31	±	0.39	3.24	±	1.52	3.57	±	0.51	8.79	±	3.35	5.65	±	1.08
<i>Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)</i>																					
Malato	1.00	±	0.04	0.41	±	0.04	0.87	±	0.08	0.99	±	0.18	0.53	±	0.13	0.94	±	0.17	0.76	±	0.14

Piruvato	1.00	±	0.04	1.06	±	0.10	0.92	±	0.08	1.16	±	0.12	1.20	±	0.35	1.18	±	0.13	1.04	±	0.15
Açúcares																					
Frutose	1.00	±	0.06	0.90	±	0.05	0.81	±	0.02	0.77	±	0.03	0.72	±	0.03	0.82	±	0.01	0.75	±	0.03
Glicose	1.00	±	0.03	0.94	±	0.02	1.13	±	0.03	1.12	±	0.02	1.01	±	0.04	1.18	±	0.10	0.95	±	0.06
Sacarose	1.00	±	0.09	0.77	±	0.03	1.27	±	0.06	1.13	±	0.11	0.77	±	0.13	1.15	±	0.09	1.10	±	0.10
Rafinose	1.00	±	0.67	0.00	±	0.00	8.18	±	1.50	30.10	±	11.34	2.53	±	2.53	5.56	±	2.63	1.81	±	1.38
Xilose	1.00	±	0.13	0.85	±	0.10	0.88	±	0.11	0.99	±	0.15	0.70	±	0.13	1.22	±	0.11	1.10	±	0.17
Açúcares álcoois																					
<i>mio</i> -inositol	1.00	±	0.12	0.81	±	0.03	1.09	±	0.15	1.00	±	0.17	0.54	±	0.13	1.00	±	0.24	0.83	±	0.16
Galactinol	1.00	±	0.07	0.45	±	0.04	10.96	±	5.08	2.76	±	0.99	0.86	±	0.29	1.63	±	0.35	4.99	±	1.84
Glicerol	1.00	±	0.07	0.97	±	0.05	1.49	±	0.11	1.37	±	0.21	1.23	±	0.07	1.29	±	0.17	1.28	±	0.24

Tabela 6. Efeito do silenciamento na expressão de *MPIS1* no perfil metabólico em sementes de frutos contendo 25 dias após a antese. Metabólitos foram identificados em plantas-controle (WT) e plantas apresentando seis níveis de silenciamento da expressão de *MPIS1*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à média das plantas WT e apresentados pela média dos valores absolutos. SE = erro padrão (n = 6).

Sementes 25 DAA	WT	SE	MT 8.25	SE	MT 2.6	SE	MT 7.13	SE	MT 1.1	SE	MT 7.2	SE	MT 1.2	SE							
Aminoácidos																					
Asparagina	1.00	±	0.70	4.03	±	0.76	1.89	±	0.21	2.20	±	0.28	2.16	±	0.24	1.20	±	0.47	1.61	±	0.42
Ácido aspártico	1.00	±	0.16	1.04	±	0.22	0.98	±	0.04	1.21	±	0.07	0.93	±	0.04	0.89	±	0.09	0.81	±	0.10
Beta-alanina	1.00	±	0.10	0.89	±	0.17	0.99	±	0.07	1.26	±	0.11	1.31	±	0.14	1.05	±	0.27	1.32	±	0.19
Ácido glutâmico	1.00	±	0.24	1.07	±	0.31	1.28	±	0.10	1.79	±	0.07	1.37	±	0.09	0.86	±	0.09	0.88	±	0.08
Glutamina	1.00	±	0.07	1.06	±	0.26	0.97	±	0.10	1.13	±	0.16	1.22	±	0.14	1.10	±	0.37	1.58	±	0.27
Glicina	1.00	±	0.12	2.36	±	0.49	1.12	±	0.15	2.25	±	0.62	1.19	±	0.11	0.92	±	0.11	1.46	±	0.28
Lisina	1.00	±	0.75	3.55	±	0.68	2.70	±	0.17	3.95	±	0.39	3.02	±	0.25	3.27	±	1.06	5.05	±	0.91
Serina	1.00	±	0.13	1.32	±	0.24	1.01	±	0.05	1.26	±	0.18	0.82	±	0.05	1.02	±	0.19	1.62	±	0.20
Treonina	1.00	±	0.20	1.19	±	0.28	0.85	±	0.10	1.11	±	0.13	0.82	±	0.04	0.72	±	0.16	1.12	±	0.17
Tirosina	1.00	±	0.30	1.57	±	0.40	0.99	±	0.15	1.54	±	0.16	0.88	±	0.12	0.73	±	0.17	0.93	±	0.20
Valina	1.00	±	0.14	1.01	±	0.25	1.30	±	0.21	1.21	±	0.08	1.08	±	0.09	0.76	±	0.23	0.68	±	0.08
Tiramina	1.00	±	0.64	2.40	±	0.63	5.02	±	0.41	2.23	±	0.70	2.85	±	0.41	4.46	±	1.22	3.44	±	0.85

Ácidos orgânicos

GABA	1.00	±	0.11	0.88	±	0.18	1.06	±	0.04	0.87	±	0.06	1.22	±	0.12	0.99	±	0.18	0.61	±	0.14
Ácido glutárico	1.00	±	0.15	1.39	±	0.29	0.69	±	0.04	0.86	±	0.08	0.83	±	0.13	0.56	±	0.08	0.56	±	0.18
Ácido láctico	1.00	±	0.42	1.32	±	0.33	1.17	±	0.41	0.75	±	0.40	0.62	±	0.16	0.56	±	0.20	0.67	±	0.15
Ácido nicotínico	1.00	±	0.06	1.31	±	0.11	1.31	±	0.05	1.68	±	0.08	1.54	±	0.07	1.89	±	0.10	2.62	±	0.17
Ácido fosfórico	1.00	±	0.14	1.17	±	0.15	1.43	±	0.02	1.43	±	0.04	1.25	±	0.05	1.23	±	0.02	0.99	±	0.10
Ácido piroglutâmico	1.00	±	0.10	1.02	±	0.13	0.79	±	0.05	0.89	±	0.10	0.83	±	0.06	0.69	±	0.20	1.06	±	0.10
Ácido quinico	1.00	±	0.37	2.20	±	0.34	2.22	±	0.05	1.99	±	0.11	1.90	±	0.26	3.16	±	0.35	2.45	±	0.56

Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)

Ácido cítrico	1.00	±	0.07	1.08	±	0.06	1.02	±	0.08	0.94	±	0.02	1.13	±	0.04	1.04	±	0.09	0.85	±	0.11
Ácido málico	1.00	±	0.13	1.13	±	0.15	1.50	±	0.03	1.24	±	0.03	1.27	±	0.07	1.61	±	0.15	1.19	±	0.14
Piruvato	1.00	±	0.10	1.46	±	0.14	1.01	±	0.05	1.99	±	0.53	1.14	±	0.07	1.30	±	0.11	1.00	±	0.10

Açúcares

Frutose	1.00	±	0.06	1.05	±	0.06	1.02	±	0.01	1.19	±	0.02	1.07	±	0.03	1.05	±	0.04	1.07	±	0.04
Glicose	1.00	±	0.05	1.15	±	0.06	1.25	±	0.02	1.21	±	0.03	1.08	±	0.03	1.21	±	0.09	1.16	±	0.06
Sacarose	1.00	±	0.06	1.03	±	0.09	1.20	±	0.01	1.30	±	0.02	1.16	±	0.05	1.15	±	0.03	1.15	±	0.01
Rafinose	1.00	±	0.80	3.19	±	1.03	2.78	±	0.32	5.97	±	0.76	4.67	±	0.86	0.68	±	0.14	0.10	±	0.10
Trealose	1.00	±	0.32	1.03	±	0.33	1.03	±	0.46	2.94	±	1.22	0.27	±	0.24	1.44	±	0.65	2.02	±	0.55
Xilose	1.00	±	0.07	1.07	±	0.19	0.87	±	0.02	0.99	±	0.07	0.66	±	0.05	1.38	±	0.23	1.53	±	0.16

Açúcares álcoois

<i>mio</i> -inositol	1.00	±	0.67	1.48	±	0.19	3.35	±	0.26	3.63	±	0.14	2.58	±	0.24	1.86	±	0.10	1.33	±	0.07
Galactinol	1.00	±	0.89	0.73	±	0.50	0.27	±	0.04	0.28	±	0.03	0.30	±	0.05	0.13	±	0.02	0.23	±	0.06
Glicerol	1.00	±	0.12	1.78	±	0.41	1.88	±	0.09	2.23	±	0.12	2.73	±	0.27	1.55	±	0.11	1.85	±	0.10
Glicerol-3-fosfato	1.00	±	0.64	3.16	±	0.34	2.90	±	0.10	3.58	±	0.08	2.84	±	0.23	2.96	±	0.39	3.48	±	0.49

Tabela 7. Efeito do silenciamento na expressão de *MPIS1* no perfil metabólico em sementes de frutos contendo 50 dias após a antese. Metabólitos foram identificados em plantas-controle (WT) e plantas apresentando seis níveis de silenciamento da expressão de *MPIS1*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à média das plantas WT e apresentados pela média dos valores absolutos. SE = erro padrão (n = 6).

Sementes 50 DAA	WT	SE	MT 8.25	SE	MT 2.6	SE	MT 7.13	SE	MT 1.1	SE	MT 7.2	SE	MT 1.2	SE
<i>Aminoácidos</i>														
Arginina	1.00	± 0.16	0.58	± 0.07	0.73	± 0.07	0.34	± 0.12	0.32	± 0.03	0.75	± 0.16	0.88	± 0.16
Asparagina	1.00	± 0.21	0.32	± 0.05	0.50	± 0.08	0.16	± 0.04	0.18	± 0.05	0.24	± 0.06	0.77	± 0.29
Ácido aspártico	1.00	± 0.16	0.50	± 0.06	0.68	± 0.05	0.32	± 0.07	0.26	± 0.06	0.53	± 0.11	0.74	± 0.13
Beta-alanina	1.00	± 0.34	1.26	± 0.21	1.03	± 0.10	0.45	± 0.17	0.39	± 0.15	0.89	± 0.20	1.37	± 0.36
Glutamina	1.00	± 0.27	0.87	± 0.09	0.97	± 0.27	0.87	± 0.19	0.68	± 0.15	1.29	± 0.35	3.93	± 1.27
Glicina	1.00	± 0.33	1.01	± 0.14	1.05	± 0.17	0.57	± 0.07	0.70	± 0.06	1.18	± 0.17	1.35	± 0.17
Homoserina	1.00	± 0.17	0.86	± 0.08	0.82	± 0.11	0.86	± 0.04	0.96	± 0.11	0.84	± 0.11	1.03	± 0.18
Isoleucina	1.00	± 0.18	0.63	± 0.07	0.76	± 0.03	0.50	± 0.09	0.38	± 0.06	0.59	± 0.05	0.93	± 0.08
Lisina	1.00	± 0.25	0.76	± 0.07	0.95	± 0.11	0.58	± 0.08	0.54	± 0.04	0.93	± 0.18	1.35	± 0.22
Ornitina	1.00	± 0.21	0.94	± 0.18	1.09	± 0.17	0.79	± 0.15	0.81	± 0.07	1.34	± 0.27	1.80	± 0.30
Fenilalanina	1.00	± 0.31	0.50	± 0.09	0.58	± 0.07	0.42	± 0.15	0.20	± 0.05	0.60	± 0.07	0.83	± 0.10
Serina	1.00	± 0.09	0.67	± 0.07	0.78	± 0.08	0.56	± 0.09	0.43	± 0.02	0.72	± 0.09	0.87	± 0.03
Treonina	1.00	± 0.25	0.89	± 0.10	1.01	± 0.08	0.61	± 0.14	0.50	± 0.10	0.87	± 0.15	1.52	± 0.31
Tiramina	1.00	± 0.22	0.87	± 0.11	0.74	± 0.39	0.71	± 0.10	0.72	± 0.14	0.60	± 0.17	0.90	± 0.27
Tirosina	1.00	± 0.29	0.50	± 0.06	0.57	± 0.06	0.37	± 0.08	0.25	± 0.03	0.57	± 0.07	0.92	± 0.07
Valina	1.00	± 0.17	1.21	± 0.19	1.30	± 0.11	1.04	± 0.17	0.57	± 0.14	0.98	± 0.12	1.59	± 0.23
<i>Ácidos orgânicos</i>														
Ácido benzoico	1.00	± 0.12	0.65	± 0.16	0.97	± 0.14	1.14	± 0.11	1.48	± 0.27	0.74	± 0.07	1.19	± 0.15
Ácido cafeico	1.00	± 0.63	1.47	± 0.59	1.90	± 0.62	0.26	± 0.26	0.83	± 0.37	0.61	± 0.41	1.19	± 0.42
GABA	1.00	± 0.13	0.79	± 0.09	0.80	± 0.07	0.18	± 0.02	0.34	± 0.06	0.58	± 0.09	0.72	± 0.07
Ácido glutâmico	1.00	± 0.22	0.88	± 0.07	0.95	± 0.09	0.51	± 0.06	0.53	± 0.08	0.93	± 0.23	1.38	± 0.28
Ácido glutárico	1.00	± 0.39	0.42	± 0.28	0.49	± 0.32	0.68	± 0.16	0.52	± 0.20	0.64	± 0.18	1.01	± 0.08
Ácido glicólico	1.00	± 0.25	0.98	± 0.43	1.70	± 0.20	0.66	± 0.18	1.24	± 0.55	1.06	± 0.31	0.92	± 0.42
Ácido isobutírico	1.00	± 0.23	1.31	± 0.15	1.87	± 0.27	2.52	± 0.10	2.73	± 0.15	2.69	± 0.07	2.99	± 0.13

Ácido láctico	1.00	±	0.11	2.42	±	0.52	1.96	±	0.47	2.08	±	0.21	1.64	±	0.27	1.30	±	0.14	1.56	±	0.24
Ácido nicotínico	1.00	±	0.05	0.99	±	0.06	1.17	±	0.06	1.08	±	0.04	0.92	±	0.02	1.05	±	0.06	1.32	±	0.05
Ácido fosfórico	1.00	±	0.08	0.98	±	0.10	0.83	±	0.16	0.36	±	0.08	0.33	±	0.02	0.70	±	0.12	0.77	±	0.15
Ácido piroglutâmico	1.00	±	0.26	0.59	±	0.04	0.64	±	0.08	0.36	±	0.06	0.43	±	0.05	0.62	±	0.10	1.18	±	0.28
Ácido quinico	1.00	±	0.19	0.44	±	0.09	0.37	±	0.07	0.23	±	0.05	0.18	±	0.04	0.17	±	0.03	0.22	±	0.05
Ácido salicílico	1.00	±	0.76	0.59	±	0.59	1.12	±	0.55	3.02	±	1.20	2.49	±	0.58	1.98	±	1.39	3.63	±	1.34
<i>Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)</i>																					
Ácido cítrico	1.00	±	0.05	0.93	±	0.06	0.75	±	0.10	0.45	±	0.08	0.56	±	0.06	0.59	±	0.06	0.64	±	0.05
Ácido succínico	1.00	±	0.24	1.32	±	0.29	1.37	±	0.27	0.72	±	0.09	0.73	±	0.15	1.16	±	0.36	1.36	±	0.40
Ácido fumárico	1.00	±	0.15	1.92	±	0.57	1.61	±	0.31	0.54	±	0.10	0.86	±	0.23	0.93	±	0.28	2.56	±	0.82
Ácido málico	1.00	±	0.27	0.96	±	0.12	0.84	±	0.15	0.34	±	0.02	0.55	±	0.08	0.66	±	0.15	0.75	±	0.07
Ácido pirúvico	1.00	±	0.08	0.92	±	0.11	0.84	±	0.10	0.84	±	0.07	1.06	±	0.24	0.57	±	0.06	0.67	±	0.06
<i>Açúcares</i>																					
Frutose	1.00	±	0.04	2.08	±	0.09	1.83	±	0.18	1.25	±	0.23	1.37	±	0.14	1.50	±	0.02	1.50	±	0.06
Glicose	1.00	±	0.15	0.54	±	0.05	0.63	±	0.12	0.34	±	0.15	0.33	±	0.04	0.54	±	0.09	0.54	±	0.08
Galactose	1.00	±	0.06	0.94	±	0.05	0.81	±	0.11	0.53	±	0.12	0.57	±	0.06	0.64	±	0.02	0.64	±	0.03
Melezitose	1.00	±	0.92	0.03	±	0.00	0.36	±	0.28	2.53	±	0.91	1.87	±	0.48	0.40	±	0.23	0.62	±	0.69
Rafinose	1.00	±	1.19	0.06	±	0.06	0.15	±	0.10	0.07	±	0.05	0.19	±	0.08	0.06	±	0.06	0.12	±	0.08
Sacarose	1.00	±	0.04	1.07	±	0.02	1.02	±	0.06	0.98	±	0.04	0.79	±	0.04	0.81	±	0.04	0.86	±	0.04
Trealose	1.00	±	1.00	2.20	±	1.40	3.45	±	1.59	3.54	±	1.39	6.08	±	2.52	4.40	±	1.91	4.13	±	0.97
Xilose	1.00	±	0.19	0.95	±	0.25	0.74	±	0.09	0.61	±	0.21	0.49	±	0.05	0.59	±	0.07	0.58	±	0.09
<i>Açúcares álcoois</i>																					
<i>mio</i> -inositol	1.00	±	0.21	1.33	±	0.23	0.95	±	0.29	0.26	±	0.04	0.30	±	0.02	1.51	±	0.71	1.58	±	0.52
<i>mio</i> -inositol-1-fosfato	1.00	±	0.14	0.77	±	0.08	1.01	±	0.20	0.64	±	0.10	0.53	±	0.04	0.79	±	0.13	0.73	±	0.09
Glicerol	1.00	±	0.10	4.09	±	0.58	2.24	±	0.56	1.20	±	0.07	1.46	±	0.14	1.79	±	0.20	1.84	±	0.33
Glicerol-3-fosfato	1.00	±	0.16	0.94	±	0.18	1.01	±	0.20	0.62	±	0.07	0.65	±	0.07	0.93	±	0.17	1.20	±	0.43
Galactinol	1.00	±	0.09	4.05	±	1.10	3.07	±	1.08	1.28	±	0.28	1.61	±	1.02	2.20	±	1.33	1.76	±	0.75

Tabela 8. Efeito do silenciamento na expressão de *MPIS1* no perfil metabólico em sementes de frutos contendo 60 dias após a antese. Metabólitos foram identificados em plantas-controle (WT) e plantas apresentando seis níveis de silenciamento da expressão de *MPIS1*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à média das plantas WT e apresentados pela média dos valores absolutos. SE = erro padrão (n = 6).

Sementes 60 DAA	WT	SE	MT 8.25	SE	MT 2.6	SE	MT 7.13	SE	MT 1.1	SE	MT 7.2	SE	MT 1.2	SE
<i>Aminoácidos</i>														
Arginina	1.00	± 0.33	1.32	± 0.31	0.85	± 0.39	0.91	± 0.39	0.77	± 0.25	0.66	± 0.25	1.15	± 0.24
Asparagina	1.00	± 0.17	0.16	± 0.06	0.12	± 0.02	0.30	± 0.08	0.23	± 0.08	0.23	± 0.06	0.20	± 0.04
Ácido aspártico	1.00	± 0.13	0.49	± 0.09	0.40	± 0.12	0.54	± 0.11	0.37	± 0.07	0.41	± 0.12	0.44	± 0.06
Beta-alanina	1.00	± 0.31	0.44	± 0.14	0.33	± 0.08	0.40	± 0.09	0.39	± 0.10	0.62	± 0.29	0.54	± 0.17
Glutamina	1.00	± 0.15	0.19	± 0.11	0.16	± 0.06	0.35	± 0.13	0.34	± 0.12	0.37	± 0.16	0.42	± 0.09
Glicina	1.00	± 0.12	1.07	± 0.11	0.72	± 0.11	0.71	± 0.09	0.79	± 0.19	0.54	± 0.05	0.61	± 0.09
Homoserina	1.00	± 0.10	0.49	± 0.11	0.42	± 0.04	0.61	± 0.15	0.65	± 0.15	0.68	± 0.22	0.56	± 0.05
Isoleucina	1.00	± 0.17	0.45	± 0.06	0.35	± 0.06	0.65	± 0.16	0.59	± 0.19	0.73	± 0.23	0.40	± 0.05
Lisina	1.00	± 0.13	0.47	± 0.13	0.51	± 0.13	0.88	± 0.26	0.59	± 0.21	0.53	± 0.14	0.50	± 0.07
Ornitina	1.00	± 0.08	0.58	± 0.03	0.53	± 0.05	0.83	± 0.14	0.90	± 0.23	0.68	± 0.06	0.58	± 0.03
Fenilalanina	1.00	± 0.19	0.36	± 0.03	0.33	± 0.03	0.58	± 0.13	0.46	± 0.11	0.54	± 0.09	0.40	± 0.03
Treonina	1.00	± 0.14	0.50	± 0.10	0.39	± 0.06	0.52	± 0.09	0.46	± 0.09	0.54	± 0.16	0.52	± 0.07
Tirosina	1.00	± 0.18	0.34	± 0.03	0.41	± 0.07	0.56	± 0.09	0.31	± 0.03	0.63	± 0.24	0.37	± 0.02
Tiramina	1.00	± 0.17	0.58	± 0.19	1.05	± 0.46	0.60	± 0.34	0.94	± 0.36	0.59	± 0.30	0.55	± 0.18
Serina	1.00	± 0.13	0.54	± 0.09	0.45	± 0.09	0.49	± 0.13	0.38	± 0.12	0.39	± 0.13	0.45	± 0.10
Valina	1.00	± 0.48	0.32	± 0.04	0.30	± 0.03	0.39	± 0.05	0.41	± 0.09	0.63	± 0.23	0.35	± 0.03
<i>Ácidos orgânicos</i>														
Ácido benzóico	1.00	± 0.21	1.16	± 0.15	0.88	± 0.21	1.05	± 0.12	0.88	± 0.13	1.00	± 0.09	0.74	± 0.24
GABA	1.00	± 0.11	0.89	± 0.23	0.66	± 0.13	0.61	± 0.12	0.76	± 0.14	0.47	± 0.06	0.75	± 0.14
Ácido cafeico	1.00	± 0.26	1.14	± 0.09	1.63	± 0.12	1.43	± 0.18	1.45	± 0.32	1.21	± 0.10	1.11	± 0.06
Ácido glutâmico	1.00	± 0.30	0.37	± 0.08	0.36	± 0.08	0.56	± 0.23	0.21	± 0.05	0.18	± 0.04	0.38	± 0.08
Ácido glutárico	1.00	± 0.34	0.99	± 0.22	1.02	± 0.17	0.65	± 0.16	0.43	± 0.08	0.41	± 0.12	0.92	± 0.28
Ácido glicólico	1.00	± 0.18	1.69	± 0.54	1.15	± 0.20	0.96	± 0.22	1.51	± 0.13	1.16	± 0.33	1.25	± 0.39
Ácido isobutírico	1.00	± 0.03	1.00	± 0.04	0.87	± 0.04	1.03	± 0.05	1.35	± 0.16	1.06	± 0.06	0.99	± 0.10
Ácido láctico	1.00	± 0.10	0.81	± 0.16	0.53	± 0.08	0.83	± 0.08	0.81	± 0.17	0.50	± 0.08	0.65	± 0.11

Ácido fosfórico	1.00	±	0.21	0.89	±	0.12	0.98	±	0.18	0.78	±	0.20	0.68	±	0.13	0.55	±	0.12	0.70	±	0.09
Ácido nicotínico	1.00	±	0.11	0.81	±	0.04	0.73	±	0.01	0.80	±	0.04	0.91	±	0.06	0.81	±	0.04	0.82	±	0.08
Ácido piroglutâmico	1.00	±	0.15	0.34	±	0.05	0.46	±	0.15	0.51	±	0.14	0.36	±	0.08	0.50	±	0.14	0.55	±	0.10
Ácido quinico	1.00	±	0.22	0.75	±	0.23	1.01	±	0.26	0.52	±	0.10	0.52	±	0.13	0.42	±	0.12	0.73	±	0.14
<i>Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)</i>																					
Ácido cítrico	1.00	±	0.18	1.26	±	0.19	1.22	±	0.20	0.93	±	0.21	0.85	±	0.16	0.97	±	0.27	1.26	±	0.21
Ácido fumárico	1.00	±	0.20	0.88	±	0.27	0.72	±	0.17	0.56	±	0.10	0.13	±	0.18	0.45	±	0.38	0.51	±	0.17
Ácido málico	1.00	±	0.14	0.78	±	0.19	1.12	±	0.23	0.68	±	0.15	0.79	±	0.25	0.47	±	0.13	1.10	±	0.26
Ácido pirúvico	1.00	±	0.20	1.18	±	0.09	0.92	±	0.10	0.81	±	0.06	0.97	±	0.13	0.83	±	0.12	1.07	±	0.12
Ácido succínico	1.00	±	0.10	0.79	±	0.05	0.84	±	0.05	0.65	±	0.04	0.79	±	0.04	0.57	±	0.12	0.70	±	0.03
<i>Açúcares</i>																					
Frutose	1.00	±	0.13	1.12	±	0.05	1.16	±	0.03	1.06	±	0.08	0.82	±	0.11	0.91	±	0.16	1.15	±	0.07
Galactose	1.00	±	0.17	1.17	±	0.07	1.18	±	0.04	1.04	±	0.11	0.98	±	0.27	0.82	±	0.19	1.13	±	0.10
Glicose	1.00	±	0.30	1.36	±	0.27	1.40	±	0.32	0.80	±	0.22	0.48	±	0.13	0.63	±	0.25	1.14	±	0.23
Melezitose	1.00	±	0.18	0.96	±	0.16	1.11	±	0.17	1.42	±	0.23	1.46	±	0.12	1.42	±	0.19	1.24	±	0.16
Rafinose	1.00	±	0.40	0.91	±	0.25	1.26	±	0.29	1.01	±	0.28	0.52	±	0.20	0.73	±	0.19	0.93	±	0.14
Sacarose	1.00	±	0.05	0.78	±	0.04	0.81	±	0.04	0.89	±	0.06	0.94	±	0.07	0.99	±	0.03	0.90	±	0.08
Trealose	1.00	±	0.37	2.06	±	0.59	1.86	±	0.63	2.68	±	1.73	0.53	±	0.23	0.46	±	0.26	1.87	±	0.55
Xilose	1.00	±	0.29	1.24	±	0.21	1.62	±	0.33	1.27	±	0.37	0.89	±	0.16	0.60	±	0.16	0.86	±	0.13
<i>Açúcares álcoois</i>																					
<i>mio</i> -inositol	1.00	±	0.23	0.77	±	0.13	1.05	±	0.30	1.14	±	0.29	0.54	±	0.09	0.43	±	0.10	0.71	±	0.14
<i>mio</i> -inositol-1-fosfato	1.00	±	0.17	0.73	±	0.11	1.03	±	0.16	1.16	±	0.24	0.80	±	0.17	0.77	±	0.15	0.82	±	0.07
Glicerol	1.00	±	0.09	0.87	±	0.07	0.65	±	0.04	0.75	±	0.03	0.82	±	0.09	0.62	±	0.02	0.65	±	0.05
Glicerol-3-fosfato	1.00	±	0.19	0.74	±	0.09	0.97	±	0.16	0.96	±	0.23	0.68	±	0.23	0.51	±	0.26	0.79	±	0.09
Galactinol	1.00	±	0.17	0.77	±	0.13	1.19	±	0.18	1.73	±	0.26	1.82	±	0.17	1.57	±	0.28	1.65	±	0.24
Ácido salicílico	1.00	±	0.15	0.90	±	0.13	0.82	±	0.11	0.88	±	0.12	0.93	±	0.08	1.10	±	0.11	1.15	±	0.12

Tabela 9. Efeito do silenciamento na expressão de *MPIS1* no perfil metabólico em folhas. Metabólitos foram identificados em plantas-controle (WT) e plantas apresentando seis níveis de silenciamento da expressão de *MPIS1*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à média das plantas WT e apresentados pela média dos valores absolutos. SE = erro padrão (n = 6).

Folhas	WT	SE	MT 8.25	SE	MT 2.6	SE	MT 7.13	SE	MT 1.1	SE	MT 7.2	SE	MT 1.2	SE
<i>Aminoácidos</i>														
Alanina	1.00 ±	0.18	0.81 ±	0.10	0.88 ±	0.10	0.77 ±	0.05	0.96 ±	0.13	0.97 ±	0.12	0.94 ±	0.05
Arginina	1.00 ±	0.07	0.61 ±	0.12	0.85 ±	0.07	0.85 ±	0.09	0.80 ±	0.10	0.94 ±	0.09	0.98 ±	0.08
Ácido ascórbico	1.00 ±	0.45	1.91 ±	0.35	1.30 ±	0.40	1.13 ±	0.34	1.67 ±	0.22	1.35 ±	0.34	1.31 ±	0.44
Asparagina	1.00 ±	0.86	-0.47 ±	0.38	-1.01 ±	0.02	0.20 ±	0.49	-0.32 ±	0.49	0.18 ±	0.38	0.00 ±	0.37
Ácido aspártico	1.00 ±	0.22	0.54 ±	0.09	0.80 ±	0.07	0.83 ±	0.14	1.16 ±	0.16	1.00 ±	0.12	0.86 ±	0.20
Cisteína	1.00 ±	0.21	1.49 ±	0.14	0.80 ±	0.26	1.19 ±	0.25	1.26 ±	0.26	1.26 ±	0.17	1.09 ±	0.12
Ácido glutâmico	1.00 ±	0.13	1.01 ±	0.07	1.16 ±	0.11	1.04 ±	0.11	1.28 ±	0.10	1.23 ±	0.04	1.37 ±	0.10
Glutamina	1.00 ±	0.20	0.63 ±	0.10	0.75 ±	0.10	0.65 ±	0.17	1.46 ±	0.38	0.76 ±	0.06	0.72 ±	0.07
Glicina	1.00 ±	0.14	0.92 ±	0.07	0.93 ±	0.07	0.80 ±	0.04	1.02 ±	0.08	0.90 ±	0.10	1.02 ±	0.06
Isoleucina	1.00 ±	0.08	0.99 ±	0.10	1.23 ±	0.16	1.19 ±	0.17	1.55 ±	0.21	1.54 ±	0.12	1.52 ±	0.11
Isomaltose	1.00 ±	0.05	0.35 ±	0.16	0.53 ±	0.19	0.57 ±	0.19	0.60 ±	0.20	0.67 ±	0.15	0.63 ±	0.14
Metionina	1.00 ±	0.11	0.77 ±	0.07	1.16 ±	0.09	0.94 ±	0.09	1.05 ±	0.13	1.29 ±	0.16	1.08 ±	0.16
Ornitina	1.00 ±	0.06	0.69 ±	0.11	1.24 ±	0.21	0.65 ±	0.08	0.89 ±	0.13	1.06 ±	0.12	0.93 ±	0.16
Fenilalanina	1.00 ±	0.21	0.89 ±	0.12	1.15 ±	0.20	1.07 ±	0.19	1.51 ±	0.24	1.64 ±	0.09	1.89 ±	0.19
Prolina	1.00 ±	0.13	0.97 ±	0.07	1.28 ±	0.21	1.18 ±	0.19	1.33 ±	0.13	1.09 ±	0.08	1.21 ±	0.20
Serina	1.00 ±	0.23	0.79 ±	0.08	0.82 ±	0.04	0.72 ±	0.02	0.89 ±	0.07	0.92 ±	0.07	0.93 ±	0.02
Treonina	1.00 ±	0.11	0.95 ±	0.05	1.05 ±	0.12	0.97 ±	0.08	1.30 ±	0.20	1.30 ±	0.06	1.44 ±	0.16
Triptofano	1.00 ±	0.24	0.84 ±	0.18	1.04 ±	0.12	1.07 ±	0.29	1.09 ±	0.16	0.73 ±	0.09	0.85 ±	0.18
Tiramina	1.00 ±	0.11	0.69 ±	0.11	0.76 ±	0.17	0.96 ±	0.22	0.60 ±	0.05	0.63 ±	0.12	0.58 ±	0.13
Tirosina	1.00 ±	0.26	0.70 ±	0.10	0.83 ±	0.09	0.75 ±	0.17	1.09 ±	0.13	0.89 ±	0.13	1.05 ±	0.11
Valina	1.00 ±	0.09	0.95 ±	0.04	1.09 ±	0.10	1.01 ±	0.13	1.32 ±	0.09	1.18 ±	0.06	1.21 ±	0.10
<i>Ácidos orgânicos</i>														
Ácido benzoico	1.00 ±	0.25	0.71 ±	0.24	0.59 ±	0.38	0.82 ±	0.27	0.48 ±	0.31	0.76 ±	0.25	0.91 ±	0.19
GABA	1.00 ±	0.32	0.67 ±	0.09	1.18 ±	0.24	0.89 ±	0.17	1.07 ±	0.30	1.08 ±	0.24	1.07 ±	0.12
Ácido cafeico	1.00 ±	0.20	1.30 ±	0.24	1.30 ±	0.27	1.27 ±	0.26	1.42 ±	0.26	1.24 ±	0.13	1.42 ±	0.34

Ácido glutárico	1.00 ±	0.30	0.82 ±	0.15	1.59 ±	0.42	1.18 ±	0.28	0.80 ±	0.17	1.21 ±	0.24	1.94 ±	0.57
Ácido glicérico	1.00 ±	0.17	1.04 ±	0.17	1.36 ±	0.19	1.21 ±	0.07	0.92 ±	0.12	1.16 ±	0.15	1.15 ±	0.11
Ácido fosfórico	1.00 ±	0.14	0.95 ±	0.19	0.88 ±	0.10	0.86 ±	0.13	1.04 ±	0.15	0.96 ±	0.22	0.98 ±	0.25
Ácido quinico	1.00 ±	0.13	0.79 ±	0.17	0.77 ±	0.16	0.87 ±	0.16	0.64 ±	0.07	0.67 ±	0.12	0.53 ±	0.12
Ácido salicílico	1.00 ±	0.19	1.35 ±	0.02	2.13 ±	0.03	1.02 ±	0.04	1.94 ±	0.22	2.30 ±	0.62	2.62 ±	0.54
Ácido treônico	1.00 ±	0.19	1.30 ±	0.07	0.78 ±	0.26	1.13 ±	0.22	1.19 ±	0.24	1.22 ±	0.13	0.96 ±	0.15
<i>Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)</i>														
Ácido cítrico	1.00 ±	0.14	1.55 ±	0.19	1.81 ±	0.30	1.53 ±	0.20	1.27 ±	0.11	1.36 ±	0.20	1.93 ±	0.45
Ácido fumárico	1.00 ±	0.31	0.74 ±	0.10	0.75 ±	0.08	0.75 ±	0.09	0.71 ±	0.06	0.73 ±	0.05	0.76 ±	0.04
Ácido isocítrico	1.00 ±	0.24	0.65 ±	0.11	0.89 ±	0.08	0.88 ±	0.10	1.11 ±	0.17	1.07 ±	0.13	1.22 ±	0.13
Ácido málico	1.00 ±	0.16	1.06 ±	0.12	1.25 ±	0.24	1.22 ±	0.11	0.95 ±	0.09	1.12 ±	0.10	1.31 ±	0.06
Ácido pirúvico	1.00 ±	0.23	0.68 ±	0.09	1.15 ±	0.28	0.89 ±	0.15	0.82 ±	0.12	0.91 ±	0.12	1.01 ±	0.29
Ácido succínico	1.00 ±	0.20	1.42 ±	0.11	1.04 ±	0.25	1.28 ±	0.18	1.09 ±	0.14	1.30 ±	0.09	1.61 ±	0.13
<i>Açúcares</i>														
Altrose	1.00 ±	0.16	0.76 ±	0.10	0.97 ±	0.06	0.96 ±	0.07	1.12 ±	0.12	1.10 ±	0.09	1.19 ±	0.08
Celobiose	1.00 ±	0.51	0.32 ±	0.32	1.99 ±	0.73	0.51 ±	0.35	0.55 ±	0.55	0.68 ±	0.43	0.93 ±	0.32
Frutose	1.00 ±	0.20	0.79 ±	0.08	0.98 ±	0.10	0.92 ±	0.09	1.25 ±	0.14	1.21 ±	0.08	1.32 ±	0.10
Frutose-6-fosfato	1.00 ±	0.05	0.93 ±	0.05	1.02 ±	0.05	1.05 ±	0.05	1.20 ±	0.06	1.19 ±	0.12	1.08 ±	0.10
Fucose	1.00 ±	0.28	0.95 ±	0.16	0.98 ±	0.18	0.72 ±	0.11	1.08 ±	0.11	1.25 ±	0.35	0.78 ±	0.09
Galactose	1.00 ±	0.16	0.76 ±	0.10	0.97 ±	0.06	0.96 ±	0.07	1.12 ±	0.12	1.10 ±	0.09	1.19 ±	0.08
Glicose	1.00 ±	0.22	0.67 ±	0.11	0.91 ±	0.08	0.91 ±	0.09	1.11 ±	0.16	1.08 ±	0.12	1.22 ±	0.11
Manose	1.00 ±	0.21	0.67 ±	0.06	0.87 ±	0.03	0.78 ±	0.06	0.67 ±	0.22	0.84 ±	0.05	0.78 ±	0.16
Ramnose	1.00 ±	0.04	0.87 ±	0.03	0.91 ±	0.02	0.95 ±	0.07	0.93 ±	0.04	0.94 ±	0.04	0.92 ±	0.01
Ribulose-5-fosfato	1.00 ±	0.10	0.95 ±	0.07	0.98 ±	0.05	0.93 ±	0.08	1.15 ±	0.08	1.07 ±	0.03	0.92 ±	0.05
Sacarose	1.00 ±	0.03	0.96 ±	0.02	1.00 ±	0.03	1.01 ±	0.03	1.06 ±	0.04	1.05 ±	0.02	1.06 ±	0.03
Trealose	1.00 ±	0.64	1.12 ±	0.71	2.15 ±	0.69	3.09 ±	0.68	3.01 ±	0.12	2.09 ±	0.68	3.07 ±	0.66
Xilose	1.00 ±	0.25	0.71 ±	0.14	0.72 ±	0.10	0.69 ±	0.07	1.07 ±	0.12	1.12 ±	0.11	1.18 ±	0.10
<i>Açúcares álcoois</i>														
Galactinol	1.00 ±	0.10	0.66 ±	0.12	0.79 ±	0.12	0.78 ±	0.15	0.74 ±	0.06	0.76 ±	0.16	0.87 ±	0.13

Glicerol	1.00 ±	0.08	0.79 ±	0.04	0.84 ±	0.07	0.85 ±	0.09	0.97 ±	0.13	0.96 ±	0.12	0.77 ±	0.06
Glicerol-3-fosfato	1.00 ±	0.10	0.67 ±	0.14	1.10 ±	0.07	0.89 ±	0.07	1.10 ±	0.17	0.98 ±	0.26	0.76 ±	0.27
<i>mio</i> -inositol	1.00 ±	0.03	0.90 ±	0.01	0.98 ±	0.02	0.95 ±	0.03	1.01 ±	0.03	1.03 ±	0.01	1.03 ±	0.02
<i>mio</i> -inositol-1-fosfato	1.00 ±	0.05	0.54 ±	0.10	0.75 ±	0.10	0.82 ±	0.08	0.62 ±	0.04	0.81 ±	0.15	0.60 ±	0.07
Lactitol	1.00 ±	0.51	0.32 ±	0.32	1.99 ±	0.73	0.51 ±	0.35	0.55 ±	0.55	0.68 ±	0.43	0.93 ±	0.32
Sorbitol	1.00 ±	0.15	0.77 ±	0.10	0.99 ±	0.06	0.97 ±	0.06	1.12 ±	0.11	1.09 ±	0.08	1.18 ±	0.07
Xilitol	1.00 ±	0.21	0.68 ±	0.08	0.82 ±	0.05	0.76 ±	0.04	1.01 ±	0.09	1.03 ±	0.10	1.12 ±	0.09