

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ESTUDO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS GENES CODIFICADORES  
DE GALACTINOL SINTASES (GOLS) COMO MARCADORES DO PROCESSO  
DE ECODORMÊNCIA DE GEMAS EM MACIEIRA (*Malus x domestica* Borkh.)**

Dissertação de Mestrado

**Patrícia Regina Dhein Picolotto**

Porto Alegre, Agosto de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ESTUDO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS GENES CODIFICADORES DE GALACTINOL SINTASES (GOLS) COMO MARCADORES DO PROCESSO DE ECODORMÊNCIA DE GEMAS EM MACIEIRA (*Malus x domestica* Borkh.)**

Patrícia Regina Dhein Picolotto

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Giancarlo Pasquali

Co-orientador: Dr. Luís Fernando Revers

Porto Alegre, Agosto de 2017

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Diogo Ribeiro Demartini

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

---

Prof. Dra. Fernanda Stanisçuaski

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

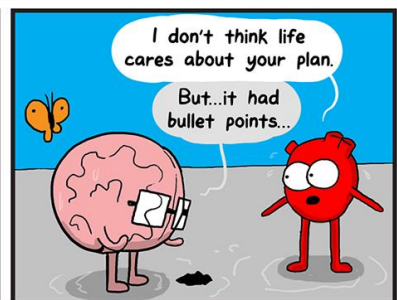
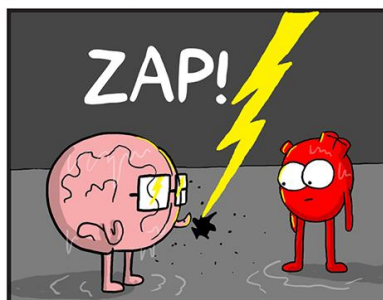
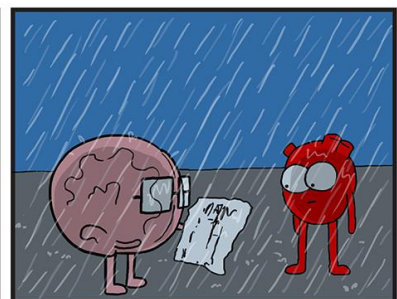
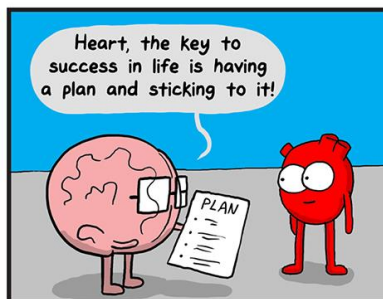
---

Prof. Dra. Márcia M.A.N. Margis-Pinheiro,

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Centro Técnico da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. Recebeu auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, sempre em primeiro lugar, aos meus pais, Ledovino e Sandra, e aos meus irmãos, Bernardo e Eduardo, por todo o apoio, seja ele emocional ou financeiro. Vocês são o alicerce de todas as minhas conquistas.

Ao meu namorado, Leomar, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, trazendo alegria aos meus dias.

Ao Dr. Giancarlo, por todos os seus ensinamentos durante a graduação e o mestrado.

Ao Dr. Luís Fernando, por ter aberto as portas do seu laboratório e pelo apoio e confiança dado a mim durante a minha passagem pela Embrapa.

Aos colegas e amigos do LGMV, Amanda, Caru, Jaiana, Julio, Lariane, Rafael, Tiago, Vanessa e Vítor, por todos momentos compartilhados.

Aos queridos amigos que a Biotec me deu e que levo sempre comigo.

Ao PPGBCM e ao CBiot, pela qualidade de ensino, especialmente à minha Comissão de Acompanhamento, Janette e Alexandre, pela atenção despendida durante estes anos, e a Sílvia e ao Luciano, pela agilidade e prontidão.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de estudo em uma universidade pública e de qualidade.

À Embrapa Uva e Vinho, por permitir acesso à sua estrutura e fornecer os recursos necessários para a realização desse trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

Aos Professores da Banca Examinadora, pela disponibilidade, pelas críticas e sugestões.

E a todos os outros que, de alguma forma contribuíram para este trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1 Dormência .....	15
1.2 Galactinol Sintase.....	17
1.3 Saída da dormência .....	21
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
2.1 Objetivo geral .....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3.1 Material biológico.....	24
3.2 Amostragem .....	24
3.3 Extração de proteínas .....	25
3.4 Quantificação de Proteínas .....	26
3.5 Anticorpos.....	26
3.6 SDS-PAGE .....	27
3.7 <i>Western blot</i> .....	28
3.8 <i>Dot blot</i> .....	28
3.9 Bloqueio do anticorpo MdGolS1 .....	29
<b>4 Resultados e Discussão.....</b>	<b>30</b>
4.1 Extração de proteínas .....	30
4.2 Confirmação da especificidade dos anticorpos .....	32

4.3	<i>Western blot</i> .....	33
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	40
6	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	41
7	<b>ANEXO A</b> .....	46
8	<b>APÊNDICE A</b> .....	48
9	<b>CURRICULUM VITAE</b> .....	50



**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES**

µg	Micrograma (s)
µL	Microlitro (s)
%	Porcentagem
° C	Grau (s) Celsius
β-ME	<i>β-mercaptoethanol</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina do soro bovino)
DREB1/CBF	<i>dehydration-responsive element binding factor 1A/cold-responsive element binding factor</i> (proteínas de ligação a elementos de resposta à desidratação)
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GalS	Galactinol sintase
GT8	Glicosiltransferases 8
h	Hora (s)
HCN	Cianamida hidrogenada
HF	Horas de frio
HSF	<i>Heat shock factors</i> (Fatores de transcrição responsivos a choque térmico)
kDa	Quilodalton
min	Minuto (s)
mg	Miligrama (s)
mL	Mililitro (s)

NBT/BCIP	<i>Nitro-Blue Tetrazolium Chloride/ 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene Difluoride</i>
PVPP	<i>Polyvinylpyrrolidone</i>
RF	Requerimento de frio
RFO	<i>Raffinose family oligosaccharides</i> (Oligossacarídeos da família da rafinose)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reativas de oxigênio)
RT	<i>Room Temperature</i> (Temperatura Ambiente)
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da DNA polimerase de forma quantitativa precedida de transcrição reversa)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TCA	<i>Trichloroacetic Acid</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
UDP	<i>Uridine-5-diphosphate</i> (Uridina-5-difosfato)
UFH	Unidades de Frio Hiberna
V	Volt

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Principais produtores de maçã .....	14
<b>Figura 2</b> As quatro estações do ano e o correspondente tipo de dormência de gemas .....	16
<b>Figura 3</b> Rota de síntese de galactinol, rafinose e estaquiose .....	18
<b>Figura 4</b> Análise do padrão de acúmulo de transcritos de genes <i>Go/S</i> por RT-qPCR durante um ciclo anual de crescimento e dormência de gemas terminais fechadas de Fuji Standard .....	20
<b>Figura 5</b> Exemplo de gema apical fechada de macieira da cultivar Fuji Standard utilizada nos estudos conduzidos no presente trabalho .....	24
<b>Figura 6</b> Exemplificação da amostragem feita durante os anos de 2009 e 2010 .....	25
<b>Figura 7</b> Alinhamento das sequências proteicas primárias de <i>Go/S1-4</i> . .....	27
<b>Figura 8</b> Imagem da membrana de PVDF resultante do <i>Western blot</i> com teste preliminar de protocolos de extração de proteínas.....	31
<b>Figura 9</b> Imagem dos géis resultantes de SDS-PAGE com extratos de proteínas totais de gemas apicais fechadas de macieira obtidos com o protocolo baseado em Zhuang <i>et al.</i> (2013) .....	32
<b>Figura 10</b> Imagem dos géis resultantes de SDS-PAGE com extratos de proteínas totais de gemas apicais fechadas de macieira obtidos com o protocolo baseado em Zheng <i>et al.</i> (2007) II .....	32
<b>Figura 11</b> Imagem da membrana de nitrocelulose resultante do <i>Dot blot</i> .....	33
<b>Figura 12</b> Imagem das membranas de PVDF resultantes do <i>Western blot</i> .....	34
<b>Figura 13</b> Imagem da membrana de PVDF resultante do <i>Western blot</i> .....	35
<b>Figura 14</b> Imagem da membrana de PVDF resultante do <i>Western blot</i> após bloqueio do anticorpo MdGo/S1 com peptídeo específico .....	36
<b>Figura 15</b> Imagem da membrana de PVDF resultante do <i>Western blot</i> .....	38

## RESUMO

A macieira (*Malus x domestica* Borkh.), uma das frutíferas mais importantes das regiões de clima temperado, é caracterizada pela cessação de crescimento visível durante o inverno, processo este chamado de dormência. A dormência de gemas permite que a planta sobreviva às baixas temperaturas e é determinante para a eficiência na produção de maçãs. Entender o processo de dormência, assim como seus mecanismos de controle, tornou-se fundamental para contornar as perdas na produção, seja por meio de técnicas de manejo ou pela geração de variedades comerciais melhor adaptadas às regiões de cultivo. A enzima galactinol sintase (GoS) catalisa a primeira etapa da via de síntese de oligossacarídeos da família da rafinose, cujo acúmulo em resposta a estresses abióticos é fato bem conhecido. Em trabalho anterior, nosso grupo mostrou um acúmulo de transcritos contrastante de quatro genes *MdGoS* durante o inverno, sugerindo-se uma possível função adaptativa desses genes durante a dormência de gemas em macieira. Pelo presente trabalho, tem-se como objetivo quantificar o acúmulo de quatro proteínas *MdGoS* em gemas apicais da macieira *Fuji Standard* visando confirmar os perfis transcricionais previamente obtidos. Anticorpos policlonais capazes de reconhecer as quatro *MdGoS* foram separadamente produzidos para emprego na técnica de *Western blot*. Análise por *Dot blot* permitiu-nos mostrar que os quatro conjuntos de anticorpos são específicos para o seu respectivo peptídeo, sem reações cruzadas. Cinco protocolos de extração de proteínas foram testados e otimizados para a obtenção de maiores quantidades de proteínas de gemas fechadas de macieira. Dois desses extratos foram escolhidos para realizar a técnica de *Western blot*. Proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford e 20 µg foi considerada a quantidade mais adequada para os ensaios. O anticorpo *MdGoS1* permitiu a detecção de sinais em ambos os extratos, mas nenhum no tamanho esperado para a respectiva proteína, isto é, com aproximadamente 38 kDa. Os anticorpos *MdGoS2*, *MdGoS3* e *MdGoS4* não permitiram detectar quaisquer sinais ou, ainda, sinais fracos que não puderam ser relacionados com o perfil transcricional previamente obtido. Estratégias alternativas, em nível proteico, para validar os níveis aumentados de transcritos de *GoS* anteriormente observados são discutidas.

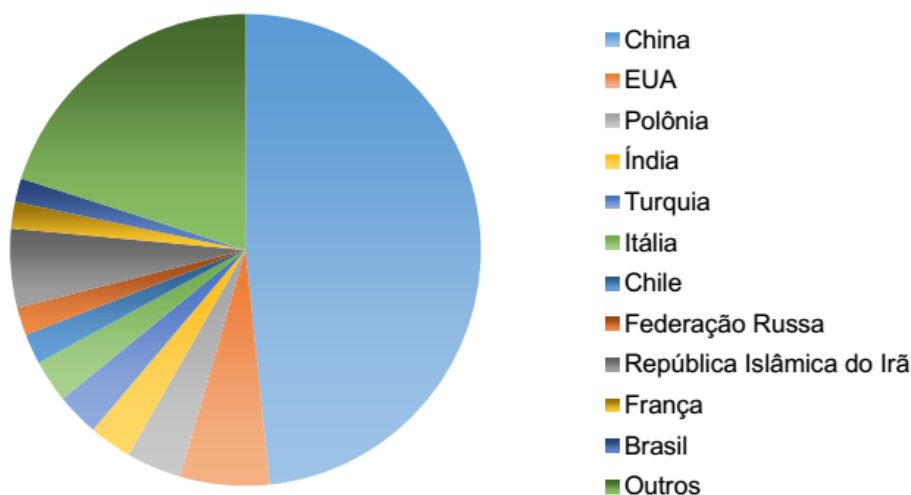
## ABSTRACT

Apple tree (*Malus x domestica* Borkh), one of the world's most important fruit crops in temperate regions, is characterized by the cessation of visible growth during winter, a process called dormancy. Bud dormancy allows plant survival under low temperatures and it is crucial for the efficiency of apple production. The knowledge about the dormancy process, as well as its control mechanisms, became an essential approach to circumvent production losses either through management techniques or by the generation of new commercial varieties better adapted to each regional cultivation environment. The galactinol synthase (GoS) enzyme catalyzes the first step in the synthesis pathway of the raffinose family of oligosaccharides, whose accumulation in response to abiotic stress is well known. A previous work of our group allowed us to show contrasting transcript levels of four *MdGoS* during winter, suggesting a possible adaptative role for some of these genes during bud dormancy. The present work aims to quantify *MdGoS* protein accumulation in apical buds of the *Fuji Standard* apple tree cultivar in order to verify and associate with transcriptional profiles previously obtained. Polyclonal antibodies that recognize the four *MdGoS* produced to perform Western blot assays. *Dot blot* analysis revealed that the four sets of antibodies were specific to their respective peptides, without cross-reactions. Five protein extraction protocols were tested and optimized for obtaining greater amounts of proteins from apple apical buds. Two of these extracts were chosen to perform Western blot assays. Total protein was quantified using the Bradford method and 20 µg was found to be the most adequate for the assay. *MdGoS1* antibody allowed the detection of signals in both extracts, but none in the expected protein mass, i.e., approximately 38 kDa. *MdGoS2*, *MdGoS3* and *MdGoS4* antibodies allowed us to detect only weak or no signals, that could not be correlated to the transcript profile previously obtained. Alternative strategies to validate the previously observed increased *GoS* transcript levels at the protein level are discussed.

## 1 INTRODUÇÃO

A macieira (*Malus x domestica* Borkh) é uma das frutíferas mais cultivadas no mundo e a quarta mais importante economicamente, ficando atrás apenas de laranjeiras, videiras e bananeiras (TROGGIO *et al.*, 2012). É uma planta de clima temperado, pertencente à tribo Pyreae, da família das Rosáceas, dentro da ordem Rosales (CANTINO *et al.*, 2007). Existem mais de 10 mil cultivares de maçãs documentadas; poucas, porém, são as que dominam a produção mundial da fruta (TROGGIO *et al.*, 2012). As cultivares mais importantes pertencem aos grupos *Golden Delicious*, *Gala*, *Fuji* e *Red Delicious*, que representam cerca de 70% da produção mundial (FIORAVANÇO *et al.*, 2010). De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), em 2014 foram produzidas 84 milhões de toneladas de maçã no mundo; o Brasil, por sua vez, ocupou a 11ª posição na produção, com mais de 1,3 milhão de toneladas (Figura 1).

### Principais Produtores de Maçã no Mundo



**Figura 1 Principais produtores de maçã no mundo.** Em 2014, a China sozinha foi responsável por cerca de 50% da produção de maçãs no mundo. O Brasil ocupou a 11ª posição, com 1,62% da produção. (Fonte: FAOSTAT, 2014)

O cultivo de maçã no Brasil teve início na década de 1970, sendo que sua produção anual não ultrapassava mil toneladas. Por meio de pesquisas, extensão rural e incentivos fiscais, a região Sul do país passou a produzir maçã com maior qualidade e quantidade, tornando-se autossuficiente e exportando parte da sua produção (AUGUSTIN & DA CRUZ, 2015).

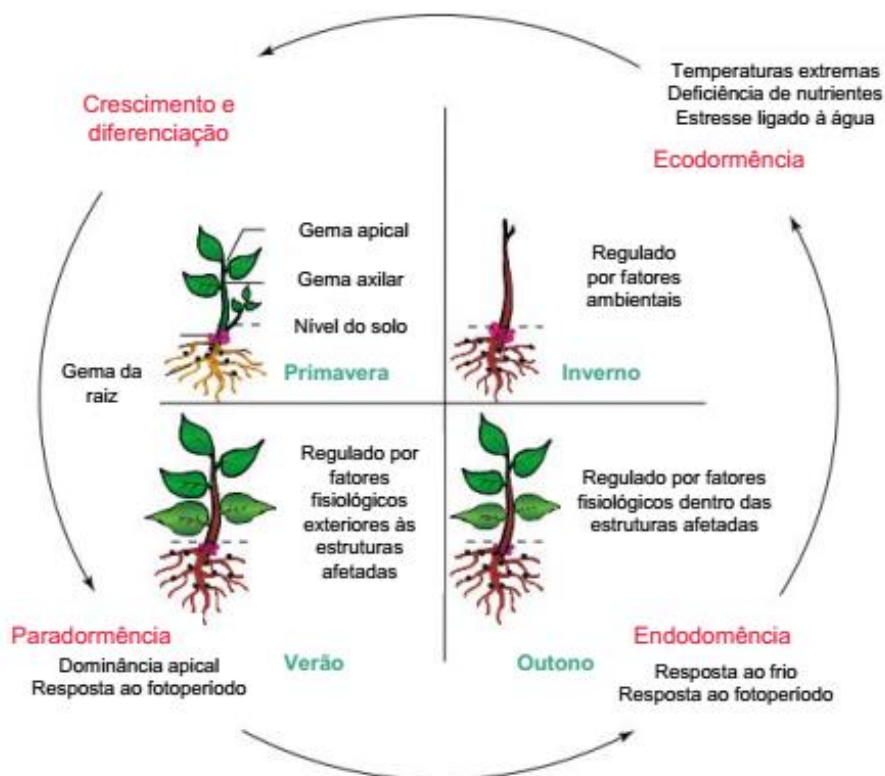
Grandes variações fenotípicas estão presentes entre cultivares de macieiras como produtividade, características do fruto, tamanho e arquitetura da planta e resistência a estresses bióticos e abióticos (TROGGIO *et al.*, 2012). Ao contrário do que se observa no resto do mundo, em que as principais cultivares produzidas são a *Golden Delicious* e a *Red Delicious*, no Brasil, as cultivares *Gala* e *Fuji* têm maior importância. Isso ocorre devido às qualidades organolépticas que essas cultivares possuem, as quais agradam o paladar do consumidor brasileiro (FIORAVANÇO *et al.*, 2010). A produção de maçã se concentra na região Sul do país, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, que apresentam condições climáticas mais propícias (RECH *et al.*, 2014). A produtividade de maçã está diretamente ligada ao processo de dormência, dado que um ciclo de dormência bem ajustado é fundamental para o alcance integral do seu potencial genético (FALAVIGNA *et al.*, 2015).

## 1.1 Dormência

Por serem sésseis, as árvores desenvolveram mecanismos que as permitem antecipar e responder às mudanças ambientais pela modulação de seu crescimento e desenvolvimento. Plantas de clima temperado possuem ciclos anuais de crescimento e dormência. Devido à vulnerabilidade de células em divisão ativa às baixas temperaturas, o desenvolvimento das plantas cessa antes do inverno começar e mudanças fisiológicas ocorrem para proteger seus meristemas contra condições rigorosas da estação (PETTERLE, KARLBERG & BHALERAO, 2013). O processo de dormência é regulado por condições ambientais como baixas temperaturas, seca e mudança no fotoperíodo (ROHDE & BHALERAO, 2007). Ao contrário da maioria das espécies lenhosas de clima temperado, a macieira não é sensível ao fotoperíodo, apenas às baixas

temperaturas (HEIDE & PRESTRUD, 2005). Acredita-se que isso ocorra entre plantas originárias da Ásia Central, em que as variações de temperatura, mais do que a qualidade da luz, marcam as mudanças das estações (CAMPOY *et al.*, 2011).

De forma geral, a dormência vegetal é definida como a incapacidade de iniciar o crescimento meristemático sob condições favoráveis (ROHDE & BHALERAO, 2007). Ela pode ser dividida em três estádios: (i) paradormência, inibição do crescimento causada por outro órgão da planta; (ii) endodormência, inibição do crescimento por sinais internos da gema; e (iii) ecodormência, inibição do crescimento por condições ambientais adversas (LANG *et al.*, 1987) (Figura 2).



**Figura 2** As quatro estações do ano e o correspondente tipo de dormência de gemas. (Fonte: Adaptado de HORVATH *et al.*, 2003)

A entrada da dormência é caracterizada pela interrupção do crescimento, pela formação de gemas e pela senescência de folhas. Uma vez dormentes, as plantas precisam ser expostas a períodos prolongados de frio, com temperatura

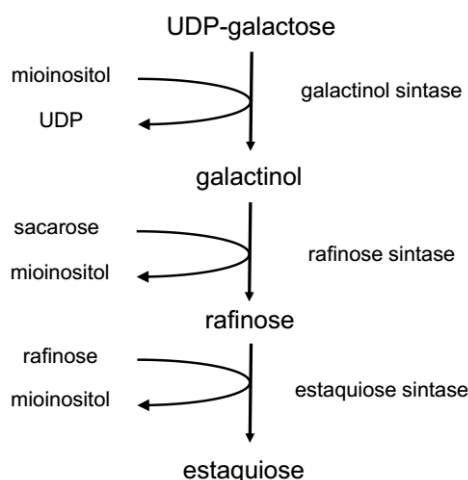


igual ou menor a 7,2 °C. O cumprimento do requerimento de frio (RF) resulta na entrada da ecodormência (LUEDELING & BROWN, 2011). A quantidade necessária de horas de frio (HF), sendo a forma de registro em unidades de frio hibernal (UFH), para superar a endodormência é variável entre espécies e cultivares (HORVATH, 2009). Um exemplo é a cultivar *Gala Standard*, que apresenta um requerimento médio de frio (800 UFH), e a sua mutante natural, a cultivar *Castel Gala*, que apresenta baixo requerimento de frio (400 UFH) (PALLADINI & PETRI, 1999; DENARDI & SECCON, 2005). Após esse período, com a entrada da planta na ecodormência, essa estará apta a reiniciar o seu ciclo vegetativo e reprodutivo quando houver condições ambientais favoráveis (JACKSON, 2003).

Apesar dos avanços de diversos grupos de pesquisa, pouco se sabe sobre o controle do processo de dormência de gemas em macieira (FALAVIGNA *et al.*, 2015). No entanto, em diversos estudos são relatadas as variações no perfil de expressão de galactinol sintases (GoS) e o acúmulo de açúcares em plantas expostas a estresses abióticos como o frio (COX & STUSHNOFF, 2001; TAJI *et al.*, 2002; DERORY *et al.*, 2006; SANTAMARÍA *et al.*, 2011; FALAVIGNA *et al.*, 2014).

## 1.2 Galactinol Sintase

A galactinol sintase (GoS; EC 2.4.1.123) é uma enzima da família das glicosiltransferases 8 (GTs; EC 2.4.x.y.). GT8 é uma grande família de enzimas envolvida na síntese de diversos conjugados de açúcares com características estruturais, de armazenamento de energia e de sinalização celular (SENGUPTA *et al.*, 2012). GoS catalisa a primeira etapa da síntese de oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs, do inglês, *raffinose family oligosaccharides*), sintetizando galactinol e uridina-5-difosfato (UDP, do inglês, *uridine-5-diphosphate*) a partir de UDP-galactose e mioinositol (NISHIZAWA *et al.*, 2008) (Figura 3).



**Figura 3 Rota de síntese de galactinol, rafinose e estaquiiose.** (Adaptado de NISHIZAWA *et al.*, 2008).

O papel de RFOs na tolerância a estresses tem sido amplamente estudado em sementes, principalmente na tolerância à dessecação e na longevidade em estado desidratado (DOWNIE *et al.*, 2003). Ainda, o acúmulo de RFOs está associado a condições de estresses abióticos como frio, calor e seca em diversas espécies (SENGUPTA *et al.*, 2015). O mecanismo exato de atuação de RFOs ainda é desconhecido. Supõe-se que esses são capazes de proteger as células vegetais contra danos oxidativos causados por diversas condições de estresse (NISHIZAWA *et al.*, 2008). As espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*) são essenciais para vários processos fisiológicos da planta e são continuamente produzidos durante a respiração mitocondrial e a fotossíntese. No entanto, estresses ambientais como a seca, o frio, o calor e a alta irradiação de luz resultam em uma concentração elevada de ROS, as quais estão associadas com dano oxidativo em nível celular (ELSAYED *et al.*, 2014). Assim, galactinol e rafinose poderiam atuar como sinalizadores do acúmulo de ROS. O mais provável, porém, é que atuem como eliminadores de ROS quando esses se acumulam em altas concentrações em locais específicos (VALLURU & VAN DEN ENDE, 2011). GolS é considerada uma das principais enzimas reguladoras da rota de síntese pois a sua atividade determina níveis de acúmulo de certos RFOs (SMITH *et al.*, 1991; PETERBAUER *et al.*, 2002).

A expressão de genes de resposta a estresses abióticos é regulada por vias de sinalização distintas. Fatores de transcrição e outras proteínas reguladoras

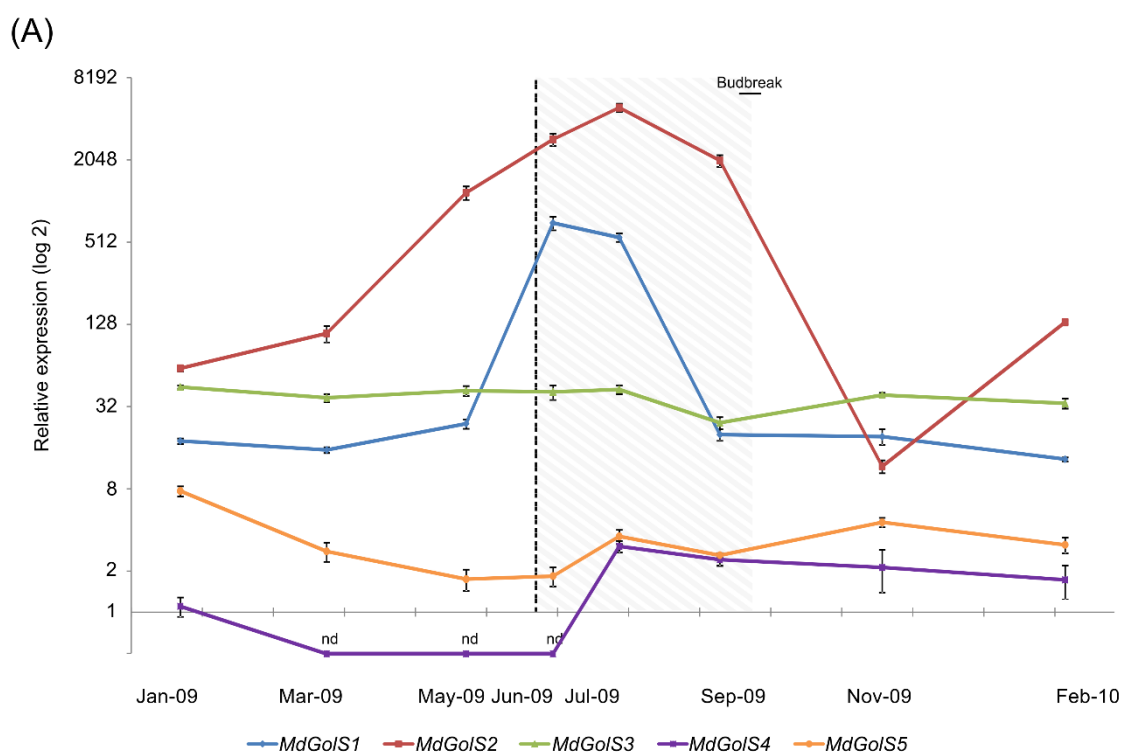
controlam as respostas a estresses a níveis transcricional e pós-transcricional (TAJI *et al.*, 2002). A expressão dos genes *GoIS* pode ser regulada por, pelo menos, três diferentes fatores de transcrição; (i) fatores de transcrição responsivos a choque térmico (HSF, do inglês, *heat shock factors*); (ii) proteínas de ligação a elementos de resposta à desidratação (DREB1/CBF, do inglês, *dehydration-responsive element binding factor 1A/cold-responsive element binding factor*); ou (iii) fatores de transcrição do tipo WRKY (ELSAYED *et al.*, 2014).

A maioria das plantas possui mais de uma isoforma de *GoIS*, sendo estas isoformas codificadas por diferentes genes. As isoformas exibem localidade ou condições específicas de expressão ligadas à síntese de RFOs (SENGUPTA *et al.*, 2012). Em *Arabidopsis thaliana*, foram identificados sete genes que codificam *GoIS* sendo que, desses, três são de resposta a estresses abióticos. Foi demonstrado que os genes *AtGoIS1* e *AtGoIS2* são induzidos por déficit hídrico e estresse salino, enquanto *AtGoIS3* é induzido apenas por baixas temperaturas. Além disso, a superexpressão de *AtGoIS2* ocasionou um aumento dos níveis de galactinol e rafinose, assim como a redução da transpiração de folhas, com um consequente aumento na tolerância à seca (TAJI *et al.*, 2002). Autores de outros estudos em *A. thaliana* também mostraram que a superexpressão de *AtGoIS1*, *AtGoIS2*, *AtGoIS4* e rafinose sintase resulta no aumento das concentrações de galactinol e rafinose, acarretando em maior tolerância ao estresse oxidativo por meio da degradação de ROS (NISHIZAWA *et al.*, 2008).

Em gemas de *Populus tremuloides*, por sua vez, foi observado que rafinose e estaquiase endógenas tiveram seus níveis aumentados à medida que as temperaturas caíram no inverno e diminuíram conforme as temperaturas aumentaram na primavera. Além disso, demonstrou-se que o acúmulo de rafinose é fortemente dependente de baixas temperaturas durante a aclimação (COX & STUSHNOFF, 2001). Falavigna *et al.* (2014) descreveram pela primeira vez em gemas dormentes de macieira que os transcritos para *GoIS* são altamente enriquecidos em amostras de inverno da cultivar *Fuji Standard* de macieira (Figura 4).

Desde então, dez modelos preditos de genes que codificam *GoIS* foram identificados no genoma da macieira. Apenas cinco desses – nomeados *MdGoIS1-5* – no entanto, foram amplificados quando utilizado um *pool* de cDNAs

de 13 tecidos e órgãos diferentes de macieiras. A expressão dos genes *MdGoIS1-5* foi quantificada pela reação em cadeia da DNA polimerase quantitativa (em tempo real) precedida de transcrição reversa (RT-qPCR) em gemas terminais fechadas amostradas durante um ciclo anual completo de crescimento e dormência (Falavigna *et al.* 2014; Figura 4). Foi observado que *MdGoIS1* e *MdGoIS2* apresentaram um acúmulo de transcritos durante a dormência, com maiores quantidades no inverno. Além disso, ambos os genes foram reprimidos em períodos próximos à saída da dormência no final do inverno no sul do Brasil (15 de setembro). *MdGoIS2* exibiu um nível maior de expressão no inverno quando comparado com os outros *MdGoIS* (30 de julho). Já *MdGoIS3* e 5 apresentaram pouca variação transcricional durante o ano. *MdGoIS4*, por sua vez, teve sua expressão completamente anulada durante a entrada da dormência (27 de maio, outono) e, somente próximo da saída da endodormência, teve sua expressão induzida no auge do inverno (30 de julho; FALAVIGNA, 2016).



**Figura 4** Análise do padrão de acúmulo de transcritos de genes *GoIS* por RT-qPCR durante um ciclo anual de crescimento e dormência de gemas terminais fechadas de Fuji Standard. A linha tracejada vertical indica o solstício de inverno no sul do Brasil (21 de julho); a área sombreada corresponde ao inverno; e a barra sólida horizontal corresponde ao intervalo de saída

da dormência (50% de brotação). A expressão relativa dos genes *Go/S* foi traçada usando-se o nível de transcritos de *MdGolS4* em 29 de janeiro como calibrador. (Fonte: FALAVIGNA, 2016)

### 1.3 Saída da dormência

A endodormência é um importante mecanismo para proteger as gemas, garantindo que os meristemas não irão retomar o crescimento até que haja condições permissivas estáveis. Isso é causado por fatores endógenos da planta que, uma vez estabelecidos, determinam que nenhum crescimento ocorrerá até que um RF particular seja alcançado. Para que a quebra de dormência possa ocorrer, as plantas precisam ser expostas a baixas temperaturas. No caso das macieiras cultivadas no sul do Brasil, estas temperaturas devem estar abaixo de 7,2 °C por um período cumulativo (HORVATH *et al.*, 2003). Uma vez satisfeito o RF, na ecodormência, o crescimento continua impedido por condições ambientais adversas. As gemas são capazes de brotar após exposição por duas ou três semanas em temperaturas na faixa dos 20 °C (BAÑUELOS *et al.*, 2008). A região Sul do Brasil, principal produtora de maçãs do país, não possui frio suficiente para atender às necessidades para a saída da dormência. Assim, tecnologias foram desenvolvidas para a indução da brotação e floração, permitindo estabilidade na produção. Além disso, avanços nos sistemas de condução e poda, manejo de colheita, raleio químico, polinização e controle fitossanitário são imprescindíveis para uma boa produção (PETRI *et al.*, 2011).

Quando as condições ideais de inverno não ocorrem, a brotação e a floração são desuniformes, com reflexos negativos na produtividade. Para superar um inverno ameno, é necessário o uso de produtos químicos para a indução da brotação e da floração para que não haja perdas massivas. A cianamida hidrogenada (HCN), comercialmente conhecida como Dormex<sup>®</sup> (BASF), é considerado o composto mais eficaz para a quebra de dormência (WANG *et al.*, 2016). Esses indutores químicos de brotação podem ser utilizados para modular a época de brotação, floração e maturação dos frutos, mesmo em regiões onde há o acúmulo necessário de frio para superar a dormência, de modo a compreender as épocas preferenciais de mercado e aumentar o número de gemas brotadas (HAWERROTH *et al.*, 2010). O domínio dessa tecnologia foi

fator decisivo para o sucesso do cultivo da macieira no Sul do Brasil, permitindo o uso de cultivares de média e alta exigências em frio, como *Gala* e *Fuji* (PETRI *et al.*, 2011).

O uso de HCN, no entanto, deve ser feito com cautela devido à sua alta toxicidade. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o produto está classificado como classe toxicológica I (extremamente tóxica) e classificação do potencial de periculosidade ambiental II (produto muito perigoso ao meio ambiente; Registro no MAPA sob nº 001095). Em 2008, a União Europeia banuiu o produto por ser considerado de alto risco ao meio ambiente e aos animais (EFSA, 2010). A necessidade do uso de Dormex®, bem como a dose a ser utilizada, dependem de muitos fatores que, mesmo para uma mesma variedade, podem ser diferentes de local para local e de ano para ano, considerando-se, principalmente, o número de horas de frio ocorridas. Assim, as recomendações do fabricante são genéricas e precisam ser ajustadas à situação de cada pomar (BASF S.A. Brasil). Um dos principais fatores limitantes do uso de HCN é a dificuldade em se saber o melhor período de aplicação do produto, visto que um erro pode levar a danos nas culturas. A aplicação precoce pode resultar em nenhum efeito ou, ainda, em um efeito negativo sobre a uniformidade da brotação. Já uma aplicação tardia pode ser também prejudicial, uma vez que a resistência ao produto químico diminui rapidamente após a saída da endodormência (OR *et al.*, 1999).

O conjunto de resultados gerados por Falavigna *et al.* (2016) despertou o interesse da utilização da MdGoIS – em especial MdGoIS4 – como marcador do processo de dormência em gemas de macieira. O objetivo que norteou o desenvolvimento da presente dissertação de mestrado foi avaliar a possibilidade de geração de uma ferramenta biotecnológica a partir dos níveis de proteínas MdGoIS encontrados em cada estágio da dormência. Assim, seria possível auxiliar o produtor na escolha da melhor época de aplicação de agentes de quebra de endodormência a partir da detecção dos níveis de MdGoIS4 a partir de testes simples ou *kits* de imunodetecção, visando, em última instância, proporcionar racionalização do uso de agentes de quebra de dormência, maior uniformidade da brotação e produção das macieiras.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial biotecnológico de MdGoIS para a sua utilização como marcador do processo de ecodormência de gemas de macieira.

### 2.2 Objetivos específicos

- a. Produzir anticorpos contra MdGoIS1, MdGoIS2, MdGoIS3 e MdGoIS4
- b. Definir protocolo padrão para extração de proteínas de gemas de macieira
- c. Comparar o acúmulo de produtos dos genes MdGoIS em níveis transcricional e proteico durante a dormência de gemas da cultivar Fuji Standard de macieira
- d. Confirmar se as proteínas MdGoIS podem ser utilizadas como marcadores do processo de ecodormência de macieira

Os resultados referentes ao item **b** foram escritos em forma de manuscrito de artigo científico, no formato da revista *Plant Methods* e está apresentado no **Apêndice A**. Os dados referentes aos demais itens compõem o restante da dissertação.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Material biológico

O material biológico utilizado consistiu de gemas apicais fechadas de plantas da cultivar Fuji Standard (Figura 5) de macieira (*Malus x domestica* Borkh.) As gemas foram amostradas de árvores adultas de um pomar experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), localizado na cidade de Caçador/SC (latitude 26° 49" 10" S; longitude 50° 59" 25" O; altitude de 935m). O pomar dispunha de plantas de sete anos de idade, enxertadas em porta-enxertos da cultivar M.7 de macieira.

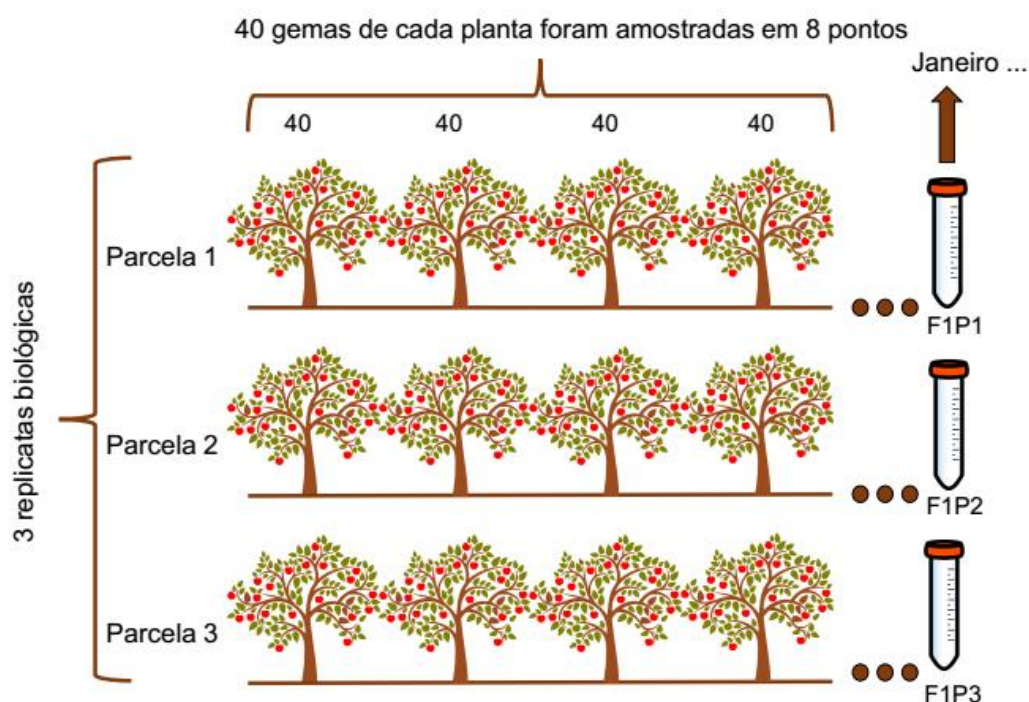


**Figura 5 Exemplo de gema apical fechada de macieira da cultivar Fuji Standard utilizada nos estudos conduzidos no presente trabalho (Fonte: arquivo pessoal)**

#### 3.2 Amostragem

O padrão de amostragem das gemas de macieira foi realizado conforme esquema ilustrado na Figura 6. Doze plantas foram dispostas em três blocos de amostragem, de quatro plantas cada. Quarenta gemas apicais fechadas de cada planta foram amostradas em oito pontos, de janeiro de 2009 a fevereiro de 2010 (Tabela 1). As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até serem utilizadas.





**Figura 6** Exemplificação da amostragem feita durante os anos de 2009 e 2010. O pomar utilizado possuía doze plantas, que foram divididas em três parcelas com quatro plantas cada. Quarenta gemas fechadas de cada planta foram amostradas, totalizando 160 gemas por parcela biológica.

**Tabela 1** Datas das amostragens, estação correspondente e horas de frio acumuladas pelas gemas terminais fechadas amostradas de árvores da cultivar Fuji Standard. A brotação (50% das gemas abertas) ocorreu em 15 de setembro de 2009.

Ponto	Data	Horas abaixo de 7,2 °C	Estação
1	21.01.2009	0	Verão
2	26.03.2009	0	Outono
3	27.05.2009	76	Outono
4	30.06.2009	278	Inverno
5	30.07.2009	450	Inverno
6	09.09.2009	528	Inverno
7	25.11.2009	0	Primavera
8	02.01.2010	0	Verão

### 3.3 Extração de proteínas

Foram utilizados os protocolos baseados em Zhuang *et al.* (2013) e Zheng *et al.* (2007) II para a extração de proteínas das gemas apicais de macieira, ambos descritos no Apêndice A. O segundo protocolo foi adaptado para tubos cônico de 50 mL tipo “Falcon”, a fim de se obter uma maior quantidade de proteínas no produto final.

### 3.4 Quantificação de Proteínas

A concentração de proteínas em extratos de gemas foi estimada empregando o método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando o reagente Bradford (Sigma Aldrich). Um protocolo para microplacas de 96 poços de fundo chato foi escolhido devido à necessidade de um volume pequeno de amostra. A quantificação foi feita de acordo com informações do fabricante. A curva padrão foi preparada em triplicatas, com concentrações de zero (branco) até 1,4 mg/mL de albumina do soro bovino – BSA, do inglês, *bovine serum albumin*. As amostras foram diluídas 10 vezes para a quantificação, que também foi feita em triplicatas.

### 3.5 Anticorpos

Anticorpos policlonais para peptídeos derivados de quatro MdGoIS (1-4) foram produzidos pela empresa GenScript Inc. (EUA), de acordo com a sequência primária predita das proteínas. Utilizando o programa *OptimumAntigen™ Design* da GenScript, foram projetados e escolhidos peptídeos específicos para cada MdGoIS, a fim de não haver reação cruzada entre eles (Figura 7). Utilizou-se coelhos para a imunização e os anticorpos foram purificados por afinidade. Junto a cada anticorpo, foi fornecido o respectivo peptídeo purificado.

```

MdGo1S2      MAPPEVPADV LQATSNSTTTGYSKRAFVTFLAGDADYVKGVVGLAKGLRKVKSEYSLVVA
MdGo1S1      MAP-AITTPTAATAATKPPSG-PNRAYVTFLAGAGDYWKGVVGLAKGLRKVKSKYPLVVA
MdGo1S3      MSP-----AETNG-PKRAYVTFLAGNGDYWKGVVGLAKGLRKAKSAYPLVVA
MdGo1S4      MAPELVPTSVPKSGFTTPATM-PSRAYVTFLAGNGDYWKGVVGLAKGLRKVKTAYPLVVA
*: *          . . . . . * : * * * * * . * * * * * * * * * * * : * . * * * *

MdGo1S2      ILPDVPEEHREILRSQGCIVQEIPIYPPEAQIKFAMAYVINYSKLRIWNFEYSKMIY
MdGo1S1      MLPDVPEEHRRILISQGCVLREIEPVHPPNQTFAMAYVINYSKLRIWEFVEYSKMIY
MdGo1S3      VLPDVPEHDHLQILHSQGCIVHAIQVYPPESQTFAMAYVINYSKLRIWEFVEYSKMIY
MdGo1S4      VLPDVPEHDHRRILESGCIVREIEPVYPPENQTFAMAYVINYSKLRIWEFVEYSKMIY
: * * * * * : * * * * * : . * : * : * * . * : * * * * * * * * * * * : * * . * * * *

MdGo1S2      LDADIQVYENIDHLFATPNGYFYAVMDFCFCEKTWSHSPQHKIGYCQQCPDKVSWP-ADMG
MdGo1S1      LDGDIQVFENIDHLFDYFDNYFYAVKDFCFCEPTWSSSPQYKIGYCQQCPNKVQWD-PKLG
MdGo1S3      LDGDIQVFENIDHLDMPGPNFYAVMDFCFCEKTWSESPQYKIGYCQQCPKQVQWP-VELG
MdGo1S4      LDGDIELYDNIDHLDLPDGHFYAVMDFCFCEKTWSHTPQYQIGYCQQCPKQVQWPTSELG
** * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

MdGo1S2      SPPPLYFNAGMFVFEPSRLTYNSLLQTLQVVPPTPFAEQDFLNMFFQKTYKPIPNINLV
MdGo1S1      PRPPLYFNAGMFVYEPSLFPVYHDLKTLQISPTTSFAEQDFLNVYFRDKYKPIPSNYNLV
MdGo1S3      SPPPRYFNAGMFVFEPCVLTCHDLETLQVTPPSLFAEQDFLNMFFREVYSPIPIINLV
MdGo1S4      PPPSLYFNAGMFVFEPLGLEYHDLRLRLVTPPTPFAEQDFLNMVFRKIYKPIPLVYNLV
. * . * * * * * * * * * * . : * * * * * : * : * * * * * * * * * * * : * . * * * * * * * *

MdGo1S2      LANLWRHPENVQLDQVNVVHYCAAGSKPWRYTGKEANMDREDIKVLVAKWWEIYNDDSLD
MdGo1S1      LAMLWRHPENIQLDQVKVVHYCANGSKPWRYTGKEENMEREDIKMLVKKWWDIYDDESLD
MdGo1S3      LAMLWRHPENVLDLQVNVVHYCAAGSKPWRYTGNEQYMEREDIKMLVKKWWDIYDDPSLD
MdGo1S4      LAMLWRHPENVLDKVKVVHYCAAGSKPWRYTGKEENMQREDIKMLVKKWWDIYNDES LD
** * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

MdGo1S2      FK-----AENPVTAEEETFSKPLSIMVSLPEPTIP-YLPAPSAA
MdGo1S1      YK-----NTVVSTEADV--QPFKEAALSEAGVPDFATAPSAA
MdGo1S3      YKNDDD-----VDDRVEKDDHEVVKLPPFFIS-RLSGTDVDEQISAPSAA
MdGo1S4      YKKAAGGAWAGGVGPEAASGGEGVNMQPFID-ALSEA AVQ-YVTAPSAA
: *          . . . . . * . . : . * * * * *

```

**Figura 7 Alinhamento das sequências proteicas primárias de GoIS1-4.** Marcado em cinza, estão os peptídeos selecionados e utilizados para a produção de anticorpos policlonais.

### 3.6 SDS-PAGE

A qualidade das extrações proteicas foi verificada por SDS-PAGE. Um volume de 4 µL de tampão de amostra (Tabela A1) foi adicionado a 16 µL de amostra. As amostras foram centrifugadas rapidamente e então incubadas por 30 min à temperatura ambiente. Uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi pipetada em gel concentrador (de entrada), contendo 4% de poli(acrilamida), e gel de corrida (Tabela A2), com 12% de poli(acrilamida) (Tabela A3). Os géis foram submetidos à eletroforese em cuba vertical (Mini-PROTEAN Tetra Cell®, Bio Rad) com tampão Tris-Glicina 1x (pH 8,3) (Tabela A4) a 85 V por 30 min e, após, 135 V por 2,5 h. Os géis foram, então, incubados com solução corante com Coomassie Brilliant Blue (Tabela A5) em agitador do tipo gangorra, sob

temperatura ambiente por 2 a 3 h. A seguir, os géis foram incubados em solução descorante (Tabela A6) nas mesmas condições. Essa última solução foi trocada de 2 a 3 vezes até contraste adequado de bandas e background.

### **3.7 Western blot**

Para a realização de *Western blots*, o método de transferência utilizado foi a eletrotransferência, com tampão contendo metanol (Tabela A7) e membrana de PVDF de 0,2 µm (Amersham Biosciences). Antes de utilizar a membrana, esta foi umedecida em metanol por alguns segundos e, após, ambientada em tampão de transferência. Os géis também foram pré-incubados em tampão de transferência para a retirada do excesso de SDS. Utilizou-se a cuba Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad) e os cassetes foram montados conforme as instruções do fabricante. As transferências foram realizadas por 1 h, com 70 V e a cuba foi colocada dentro de um isopor com gelo para evitar superaquecimento. Após a transferência, foi feito o bloqueio da membrana com solução TBS (Tabela A8) e 5% de leite em pó desnatado (Molico).

Após bloqueio das membranas, essas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários (anti-MdGoIS1-4) na solução de bloqueio sob agitação. As membranas foram lavadas três vezes com tampão TTBS (TBS + 0,05% de Tween-20) e, após, incubadas com TTBS contendo o anticorpo secundário anti-coelho IgG (Sigma Aldrich) diluído 2.000 vezes, por 1 h e à temperatura ambiente sob agitação. A seguir, as membranas foram lavadas quatro vezes com tampão TTBS e incubadas com solução reveladora utilizando uma pastilha de NBT/BCIP (Sigma Aldrich) dissolvida em 10 mL de água. Por fim, as membranas foram lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente. As quantidades de amostras e concentrações dos anticorpos utilizados estão descritas junto aos resultados.

### **3.8 Dot blot**

Uma massa correspondente a 6  $\mu\text{g}$  de cada peptídeo foi pipetada em quatro membranas de nitrocelulose distintas, com uma distância suficiente para que não houvesse contato entre eles. Após secagem das membranas, estas foram incubadas separadamente em solução de bloqueio por 1 h e à temperatura ambiente sob agitação. Cerca de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticorpo primário (anti-MdGoIS1-4) foi adicionado a cada membrana e as soluções foram mantidas *o/n* em temperatura ambiente sob agitação. No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes com tampão TTBS e, então, incubadas com TTBS contendo o anticorpo secundário anti-coelho IgG (Sigma Aldrich) diluído 2000 vezes, por 1 h com agitação e à temperatura ambiente. Após, as membranas foram lavadas quatro vezes com tampão TTBS. A seguir, as membranas foram incubadas em solução reveladora utilizando-se uma pastilha NBT/BCIP (Sigma Aldrich) dissolvida em 10 mL água. Por fim, as membranas foram lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente.

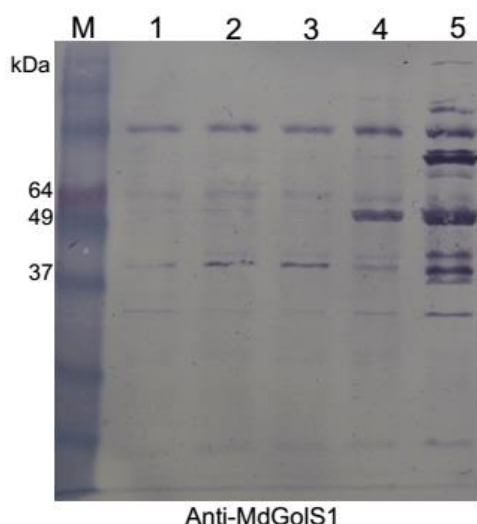
### **3.9 Bloqueio do anticorpo MdGoIS1**

Seguiu-se o descrito nos itens 3.6 e 3.7 com a seguinte alteração: o anticorpo primário MdGoIS1 foi pré-incubado com 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do seu peptídeo em solução de bloqueio por 2 h à temperatura ambiente. Após, essa solução foi colocada em contato com a membrana previamente bloqueada.

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Extração de proteínas

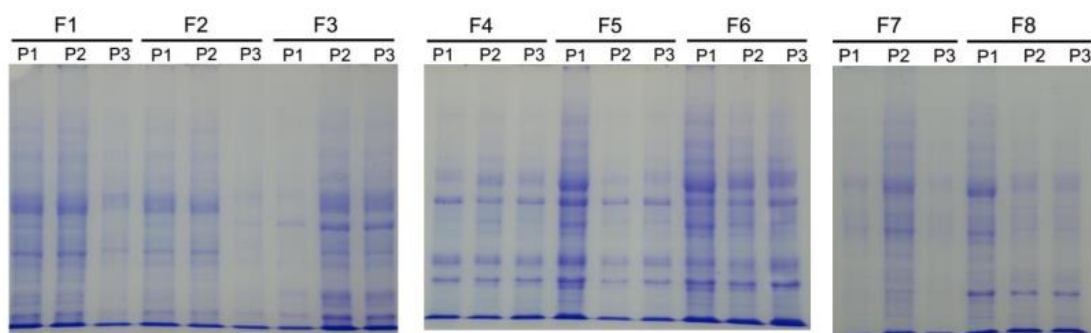
Diversos protocolos para a extração de proteínas de gemas apicais fechadas de macieira foram testados. O emprego de quaisquer desses protocolos, porém, resultou em uma baixa quantidade de proteínas no extrato final e, também, em nenhum sinal obtido nos *Western blots* realizados (resultados não apresentados). Os protocolos de extração de proteínas vegetais, em geral, são comumente referenciados na literatura para emprego em tecidos não excessivamente lignificados como, por exemplo, folhas. Com uma busca mais refinada, encontrou-se cinco protocolos utilizados preferencialmente para a extração de proteínas de amostras de tecidos lenhosos. Esses protocolos foram testados em gemas da cultivar Gala de macieira e estão descritos no Apêndice A da presente Dissertação. Após um *Western blot* preliminar (Figura 8), utilizando o anticorpo anti-MdGolS1, decidiu-se seguir com as extrações com os protocolos 3 e 5 (Figura 8), baseados em Zhuang *et al.* (2013), que utiliza TCA-acetona como solução de precipitação, e Zheng *et al.* (2007) II, que preconiza o uso de fenol. A escolha do protocolo 3 foi feita devido ao sinal presente em 37 kDa, esperado para GolS; para o protocolo 5, por sua vez, considerou-se a alta quantidade de sinais obtidos.



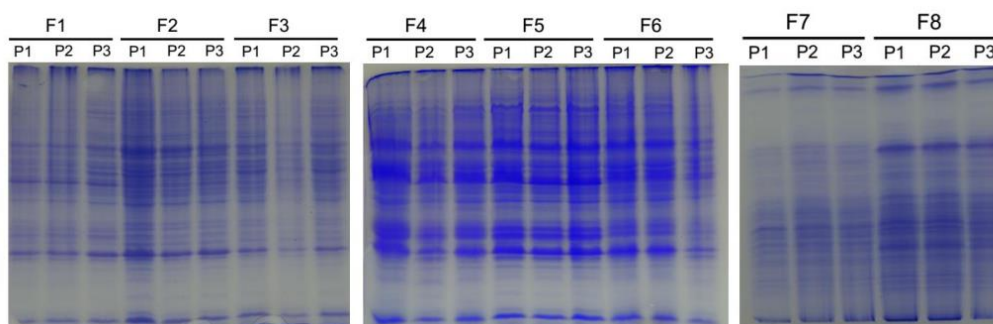
**Figura 8** Imagem da membrana de PVDF resultante do *Western blot* com teste preliminar de protocolos de extração de proteínas. Foi utilizado o anticorpo anti-MdGolS1 (0,1 µg/mL) e 20 µg de proteínas totais para o teste. 1, protocolo baseado em Damerval *et al.* (1986); 2, protocolo baseado em Renaut *et al.* (2008); 3, protocolo baseado em Zhuang *et al.* (2013); 4, protocolo baseado em Zheng *et al.* (2007) I; 5, protocolo baseado em Zheng *et al.* (2007) II; M, BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific). Os protocolos estão descritos no Apêndice A.

A inativação de proteases é essencial para uma boa extração de proteínas e é difícil de ser realizada em amostras de plantas. A precipitação com TCA, por sua vez, é considerado um dos métodos mais eficientes para a inibição de proteases, fenoxidases e peroxidases. Também foi demonstrado que a suspensão subsequente das proteínas precipitadas com TCA/acetona em tampões contendo ureia não resulta na reativação das proteases (VÂLCU & SCHLINK, 2006). A extração com fenol é amplamente utilizada e referenciada na literatura científica pois as proteínas são desnaturadas e dissolvidas na fase fenólica, separando-as de outras substâncias como sais, ácidos nucleicos e carboidratos, que permanecem na fase aquosa. As substâncias fenólicas coextraídas são, então, separadas das proteínas após a precipitação com TCA/acetona ou metanol (WU *et al.*, 2014).

As extrações de proteínas de gemas apicais fechadas durante um ciclo anual da cultivar Fuji de macieira foram realizadas conforme descrito no item 3.3 e a qualidade das mesmas foi verificada por SDS-PAGE (Figura 9 e 10). Todas as amostras foram quantificadas empregando-se o método de Bradford.



**Figura 9** Imagem dos géis resultantes de SDS-PAGE com extratos de proteínas totais de gemas apicais fechadas de macieira obtidos com o protocolo baseado em Zhuang *et al.* (2013). F1-F8 correspondem aos pontos em que as gemas foram amostradas (Tabela 1). P1-P3 correspondem às replicatas biológicas.



**Figura 10** Imagem dos géis resultantes de SDS-PAGE com extratos de proteínas totais de gemas apicais fechadas de macieira obtidos com o protocolo baseado em Zheng *et al.* (2007) II. F1-F8 correspondem aos pontos em que as gemas foram amostradas (Tabela 1). P1-P3 correspondem às replicatas biológicas.

A utilização do protocolo baseado em Zhuang *et al.* (2013) (Figura 9) resultou em um menor número de proteínas totais, identificadas pelo número de bandas observadas no gel, quando comparado ao protocolo baseado em Zheng *et al.*, (2007) (Figura 10). Não foi constatado que houve degradação das proteínas, visto que as bandas estão nítidas e sem sinal de arraste.

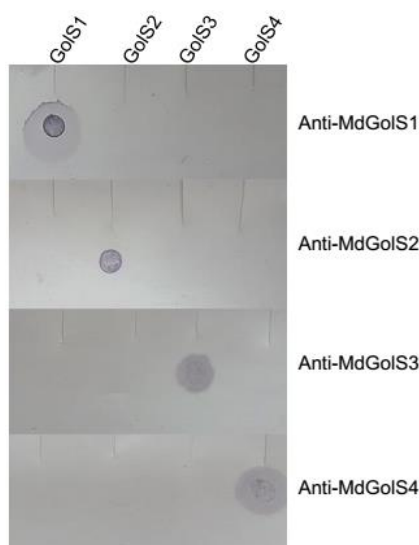
#### 4.2 Confirmação da especificidade dos anticorpos

Após definição das regiões peptídicas exclusivas das sequências de cada uma das quatro GolS (Figura 7), estas foram encaminhadas à empresa GenScript Inc. para síntese dos peptídeos e geração dos anticorpos policlonais.



Como resultado, a empresa enviou, junto com os anticorpos, os respectivos peptídeos utilizados para a imunização de coelhos para a produção dos mesmos.

A especificidade de cada anticorpo para o seu respectivo peptídeo-alvo foi testada por *Dot blot*. Em cada membrana de nitrocelulose foram pipetados os peptídeos imunogênicos para MdGolS1-4. A seguir, as membranas foram incubadas com os diferentes anticorpos, separadamente. Pode-se observar, na Figura 11, que o sinal de cada hibridização peptídeo-anticorpo foi específico, mostrando seu bom funcionamento e que não há reação cruzada no reconhecimento entre peptídeos e anticorpos.



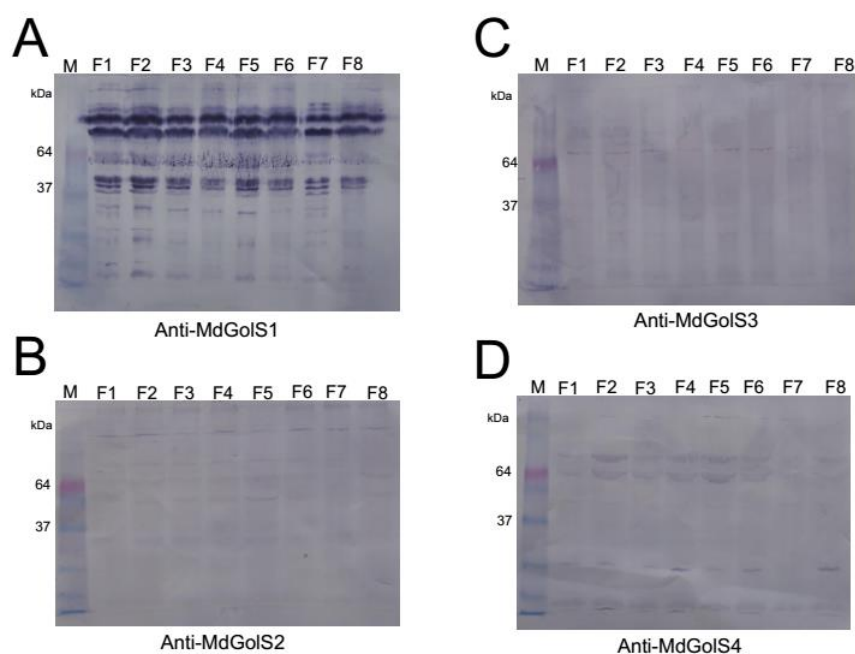
**Figura 11** Imagem da membrana de nitrocelulose resultante do *Dot blot*. MdGolS1-4 correspondem ao peptídeo (6  $\mu$ g); Anti-MdGolS1-4 correspondem ao anticorpo utilizado (1  $\mu$ g/mL). Houve reconhecimento específico de todos os anticorpos ao seu respectivo peptídeo.

### 4.3 *Western blot*

Não existe um protocolo definido para a técnica de *Western blot*. Inúmeras alterações em diversas etapas podem ser feitas e cada passo é importante para a obtenção de bons resultados (KURIEN & SCOFIELD, 2006; MACPHEE, 2010; EMD MILLIPORE, 2012; MAHMOOD & YANG, 2012; MURPHY & LAMB, 2013). As principais modificações que podem ser feitas na metodologia de *Western blot* tem por foco as quantidades de proteínas e anticorpos utilizadas. Devido a presença de ureia e tiourea no tampão final utilizado para solubilizar as

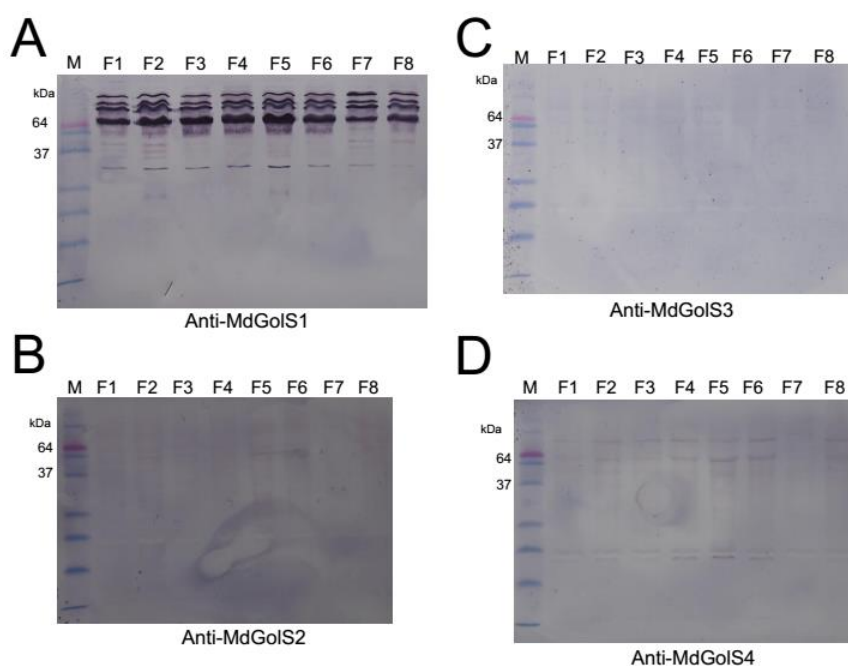
proteínas, as amostras não foram fervidas. Assim, evitou-se as suas hidrólises e reações secundárias não desejadas (CAÑAS *et al.*, 2007).

Inicialmente, testou-se o uso de 40 µg de proteínas totais extraídas com o protocolo baseado em Zheng *et al.* (2007) II e 1 µg/mL de anticorpo primário. As membranas foram bloqueadas *o/n* e os anticorpos primários foram incubados com as membranas por 1 h à temperatura ambiente. A utilização de anti-MdGolS1 (Figura 12.A) nessas condições resultou em sinais (ruídos) de fundo (*background*) elevados, possivelmente causados pelo excesso de anticorpo primário ou de proteínas (EMD MILLIPORE, 2012). Além disso, não houve qualquer variação no padrão de bandas de hibridização nas amostras ao longo do ciclo anual. A utilização de anti-MdGolS2 (Figura 12.B), anti-MdGolS3 (Figura 12.C) e anti-MdGolS4 (Figura 12.D) resultaram em sinais fracos e nenhuma banda no tamanho esperado. De acordo com a predição das sequências primárias das proteínas MdGolS1-4, as massas moleculares esperadas para elas seriam de 38 kDa, 38 kDa, 37 kDa e 39 kDa, respectivamente.



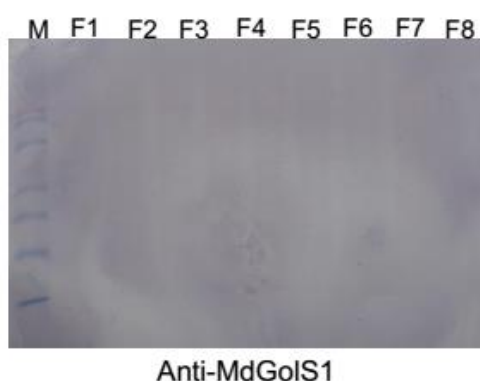
**Figura 12** Imagem das membranas de PVDF resultantes do *Western blot*. F1-F8 correspondem aos pontos do ciclo anual em que as gemas foram amostradas (Tabela 1). Massa correspondente a 40 µg de proteínas totais foram aplicadas e resolvidas por SDS-PAGE. Anti-MdGolS1-4 correspondem ao anticorpo primário utilizado (1 µg/mL). M: *BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder* (ThermoFisher Scientific). Proteínas extraídas com o protocolo baseado em Zheng *et al.* (2007) II.

Na tentativa de aumentar as especificidades das hibridizações proteínas-anticorpos, as membranas passaram a ser bloqueadas por um período de 2 h à temperatura ambiente e, após, incubadas com os anticorpos *o/n* à 4 °C. Adicionalmente, uma concentração menor de anticorpos, de 0,1 µg/mL, foi utilizada (EMD MILLIPORE, 2012). Também reduziu-se a quantidade de proteínas totais aplicadas em gel para 20 µg pois proteínas pouco expressas podem, muitas vezes, ser melhor detectadas reduzindo-se a quantidade de amostra carregada (MURPHY & LAMB, 2013). Nessas condições, a utilização de anti-MdGolS1 (Figura 13.A) resultou em uma redução no *background*. Porém, ainda assim, não se observou a variação esperada no padrão de bandas, conforme ilustrado na Figura 4. Para anti-MdGolS4 (Figura 13.D), não houve variação com as condições anteriores. Já para anti-MdGolS2 e anti-MdGolS4, nenhum sinal foi observado (Figura 13.B e 13.C, respectivamente).



**Figura 13** Imagem da membrana de PVDF resultante do *Western blot*. F1-F8 correspondem aos pontos do ciclo anual em que as gemas foram amostradas (Tabela 1). Massa correspondente a 20 µg de proteínas totais foram aplicadas e resolvidas por SDS-PAGE. Anti-GolS1-4 correspondem ao anticorpo primário utilizado (0,1 µg/mL). M: *BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder* (ThermoFisher Scientific). Proteínas extraídas com o protocolo baseado em Zheng *et al.* (2007) II.

Uma possível explicação para o excesso de sinais obtidos quando utilizado o anticorpo anti-MdGolS1 seria a presença de outros anticorpos provenientes do coelho imunizado para a produção dos mesmos, e que estariam reconhecendo proteínas no extrato. Apesar dos anticorpos terem sido purificados por afinidade com o antígeno pela empresa *GenScript*, foi feito o bloqueio do anticorpo MdGolS1 utilizando seu respectivo peptídeo. A ausência de sinais no *Western blot* (Figura 14) mostrou que não há contaminantes e, portanto, todos os sinais obtidos (Figura 13.A) são possivelmente específicos à MdGolS1.

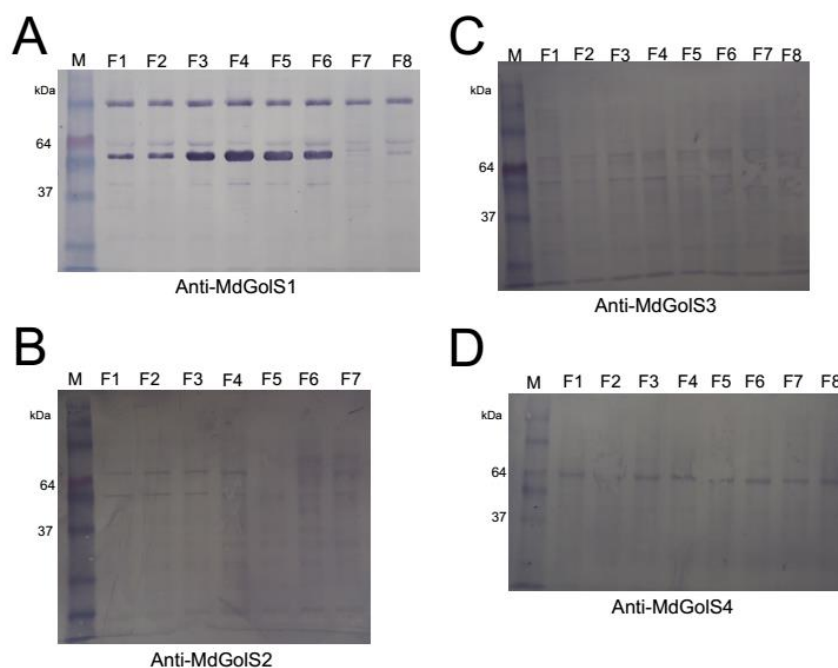


**Figura 14** Imagem da membrana de PVDF resultante do *Western blot* após bloqueio do anticorpo MdGolS1 com peptídeo específico. F1-F8 correspondem aos pontos do ciclo anual em que as gemas foram amostradas (Tabela 1). Massa correspondente a 20 µg de proteínas totais foram aplicadas e resolvidas por SDS-PAGE. Anti-MdGolS1 corresponde ao anticorpo primário utilizado (0,1 µg/mL). M: *BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder* (ThermoFisher Scientific). Proteínas extraídas com o protocolo baseado em Zheng *et al.* (2007) II.

A realização de *Western blots* com proteínas extraídas conforme protocolo baseado em Zhuang *et al.* (2013) permitiu melhores resultados quando comparado aos dados descritos anteriormente (Figura 13). A utilização de anti-MdGolS1 resultou, pela primeira vez, em um sinal que altera sua intensidade no decorrer do ciclo anual, com massa molecular de aproximadamente 49 kDa (Figura 15.A). A variação no acúmulo proteico ocorreu como previsto pelo acúmulo de transcritos (Figura 4), com exceção dos pontos F7 e F8 em que deveria haver um sinal de intensidade similar a F1. Adicionalmente, o tamanho previsto para MdGolS1 seria de 38 kDa. No entanto, migrações anômalas em géis podem ocorrer, ou seja, as proteínas não migram, necessariamente, conforme seus pesos moleculares estimados em virtude de suas conformações

e estruturas (MURPHY & LAMB, 2013). Por esta razão, torna-se necessário o uso de um controle positivo, no caso uma proteína purificada, para comparar os padrões de migrações. Entretanto, para o presente trabalho, não havia disponível uma proteína GolS purificada. Além disso, modificações pós-traducionais como fosforilação e glicosilação podem ocorrer, aumentando a massa da proteína (KURIEN & SCOFIELD, 2006).

Já para os anticorpos anti-MdGolS2-4 (Figura 15.B, 15.C e 15.D, respectivamente) empregados em *Western blots* contra extratos proteicos totais obtidos pelo método de Zhuang *et al.* (2013), os sinais obtidos não puderam ser relacionados com o perfil transcricional (Figura 4), já que foram de mesma intensidade em todos os pontos de coleta do ciclo anual. A identificação de MdGolS4, considerada a de maior importância, não foi possível com a utilização do respectivo anticorpo. De acordo com o perfil transcricional (Figura 4), a proteína deveria estar ausente nos pontos F2, F3 e F4, tendo o início da sua detecção a partir de F5. No entanto, no *Western blot* resultante é possível observar um sinal constante com tamanho aproximado de 69 kDa. Uma busca na versão 1.0 do genoma da macieira (<https://www.rosaceae.org/>) utilizando-se a sequência do peptídeo no qual o anticorpo foi feito permitiu encontrar, além da proteína MdGolS4, 92% de identidade com a proteína MdGolS10. No entanto, não foi detectada a presença de transcritos do gene *MdGolS10* durante o ciclo vegetativo e reprodutivo de macieira (FALAVIGNA, 2016). Além disso, MdGolS10 possui um tamanho estimado de 29 kDa. Deve-se ressaltar que o genoma da macieira ainda não foi finalizado até o término desse trabalho e que alterações podem ocorrer com novas versões. Os sinais fracos e inespecíficos obtidos utilizando os anticorpos anti-MdGolS2-4 podem ser resultado da utilização de anticorpos policlonais, pois esses são capazes de reconhecer múltiplos epítomos do antígeno utilizado para sua produção, e que podem estar presentes em outras proteínas (GenScript).



**Figura 15** Imagem da membrana de PVDF resultante do **Western blot**. F1-F8 correspondem aos pontos do ciclo anual em que as gemas foram amostradas (Tabela 1). Massa correspondente a 20  $\mu$ g de proteínas totais foram aplicadas e resolvidas por SDS-PAGE. Anti-GolS1-4 correspondem ao anticorpo primário utilizado (0,1  $\mu$ g/mL). M: *BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder* (ThermoFisher Scientific). Proteínas extraídas com o protocolo baseado em Zhuang *et al.* (2013).

O fato de não ter sido possível detectar MdGolS2-4 pode ter sido devido à incapacidade dos anticorpos em reconhecer o peptídeo imunogênico na proteína. Anticorpos produzidos contra peptídeos sintéticos, apesar de serem fortemente reativos ao peptídeo, muitas vezes falham em reconhecer a proteína, em especial quando essas não estão totalmente desnaturadas (DREYER *et al.*, 2010). A utilização de um anticorpo monoclonal, por sua vez, poderia ser testada, pois esses são mais sensíveis e específicos para a proteína de interesse (MACPHEE, 2010).

Sabe-se, ainda, que nem sempre é possível utilizar níveis de transcritos de um gene para estimar níveis de proteínas correspondentes. Um dos motivos para isso, são as diferenças nos protocolos utilizados para detecção de proteínas e mRNA e a variação na sensibilidade de detecção e análise de dados. Também, processos regulatórios que ocorrem após a produção de mRNA – como regulação pós-transcricional, traducional e na degradação de proteínas – podem controlar a abundância de proteínas no estado estacionário (VOGEL & MARCOTTE, 2013). Em plantas, relativamente poucos estudos comparam a

expressão de mRNA e proteína e, no geral, existe uma correlação variável entre os níveis (VÉLEZ-BERMÚDEZ & SCHMIDT, 2014).

Os estudos encontrados na literatura sobre GolS tratam, no seu geral, da variação do perfil transcricional de plantas expostas a estresses abióticos, como seca e frio, das respostas de plantas após a superexpressão desses genes ou, ainda, do acúmulo de RFOs (TAJI *et al.*, 2002; ZUTHER *et al.*, 2004; SUN *et al.*, 2013; ELSAYED *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2014; FALAVIGNA *et al.*, 2014). No entanto, até o momento, não foram relatados dados sobre as enzimas galactinol sintases, em especial quanto ao seu nível de tradução e estabilidade, que são pontos decisivos para a sua detecção por *Western blot*. Assim, mais estudos são necessários para a confirmação do motivo da ausência de sinal nos *Western blots* utilizando anticorpos contra MdGols2-4 apresentados na presente dissertação.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho confirmaram que a proteína MdGolS1 está presente em gemas fechadas de macieira da cultivar *Fuji Standard* conforme o perfil transcricional previamente descrito. Já no caso de MdGolS2-4, não foi possível a detecção nas condições utilizadas no presente trabalho.

Para a MdGolS4, a não detecção pode ter sido causada pela baixa concentração de proteína nos extratos (MAHMOOD & YANG, 2012), considerando que essa apresentou os menores níveis de expressão previamente determinados (Figura 4). Sendo assim, não é possível a utilização de MdGolS4 como um marcador do processo de ecodormência de gemas de macieira; tampouco, é possível descartar o seu uso sem maior investigação.



## 6 REFERÊNCIAS

- AUGUSTIN, B. & DA CRUZ, C. T. Custos de produção e expectativas de retorno associados a produção de um hectare de maçã no planalto norte catarinense. *Ágora: revista de divulgação científica*. 20(1): 105–121, 2015.
- BAÑUELOS, M. L. G.; MORENO, L. V.; WINZERLING, J.; OROZCO, J. A.; GARDEA, A. A. Winter metabolism in deciduous trees: mechanisms, genes and associated proteins. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 31(4): 295–308, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1–2): 248–254, 1976.
- CAMPOY, J. A.; RUIZ, D.; EGEA, J. Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: A review. *Scientia Horticulturae*. 130(2): 357–372, 2011.
- CAÑAS, B.; PIÑEIRO, C.; CALVO, E.; LÓPEZ-FERRER, D.; GALLARDO, J. M. Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. *Journal of Chromatography A*. 1153(1–2): 235–258, 2007.
- CANTINO, P. D.; DOYLE, J. A.; GRAHAM, S. W.; JUDD, W. S.; OLMSTEAD, R. G.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; DONOGHUE, M. J. Towards a phylogenetic nomenclature of Tracheophyta. *Taxon*. 56(3): 822–846, 2007.
- COX, S. E. & STUSHNOFF, C. Temperature-related shifts in soluble carbohydrate content during dormancy and cold acclimation in *Populus tremuloides*. *Canadian Journal of Forest Research*. 31(4): 730–737, 2001.
- DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*. 7(1): 52–54, 1986.
- DENARDI, F.; SECCON, J. J. “Castel Gala” - Mutação da macieira “Gala” com baixa necessidade de frio e maturação precoce. *Agropecuaria Catarinense (Brasil)*. 18(2): 78–82, 2005.
- DERORY, J.; LÉGER, P.; GARCIA, V.; SCHAEFFER, J.; HAUSER, M. T.; SALIN, F.; LUSCHNIG, C.; PLOMION, C.; GLÖSSL, J.; KREMER, A. Transcriptome analysis of bud burst in sessile oak (*Quercus petraea*). *New Phytologist*. 170(4): 723–738, 2006.
- DOWNIE, B.; GURUSINGHE, S.; DAHAL, P.; THACKER, R. R.; SNYDER, J. C.; NONOGAKI, H.; YIM, K.; FUKANAGA, K.; ALVARADO, V.; BRADFORD, K. J. Expression of a GALACTINOL SYNTHASE gene in tomato seeds is up-regulated before maturation desiccation and again after imbibition whenever radicle protrusion is prevented. *Plant Physiology*. 131(3): 1347–1359, 2003.
- DREYER, A. M.; BEAUCHAMP, J.; MATILE, H.; PLUSCHKE, G. An efficient system to generate monoclonal antibodies against membrane-associated proteins by immunisation with antigen-expressing mammalian cells. *BMC Biotechnology*. 10(1): 87, 2010.
- EFSA CONCLUSION. Conclusion on the peer review of the pesticide risk

assessment of the active substance cyanamide. 8(11): 1–61, 2010.

ELSAYED, A. I.; RAFUDEEN, M. S.; GOLLDACK, D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: Protection against abiotic stress. *Plant Biology*. 16(1): 1–8, 2014.

EMD MILLIPORE. Protein Blotting Handbook EMD. Millipore Corporation, 2012.

FALAVIGNA, V. S. Análise funcional e potencial biotecnológico de desidrinases e galactinol sintases de macieira. Tese de doutorado, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

FALAVIGNA, V. S.; PORTO, D. D.; BUFFON, V.; MARGIS-PINHEIRO, M.; PASQUALI, G.; REVERS, L. F. Differential transcriptional profiles of dormancy-related genes in apple buds. *Plant Molecular Biology Reporter*. 32(4): 796–813, 2014.

FALAVIGNA, V. S.; PORTO, D. D.; SILVEIRA, C. P.; REVERS, L. F. Recent advances in genetics and molecular control of bud dormancy in pipfruits. In: ANDERSON, J. V. *Advances in Plant Dormancy*, Cham: Springer International Publishing, Cap 5, 107–122 2015.

FIORAVANÇO, J. C.; GIRARDI, C. L.; CZERMAINSKI, A. B. C.; SILVA, G. A.; NACHTIGALL, G. R.; OLIVEIRA, P. R. D. Cultura da macieira no Rio Grande do Sul: análise situacional e descrição varietal. *Embrapa Uva e Vinho*. 1–60, 2010.

HAWERROTH, F. J.; PETRI, J. L.; LEITE, G. B.; HERTER, F. G. Brotação de gemas em macieiras “Imperial Gala” e “Fuji Suprema” pelo uso de Erger® e nitrato de cálcio. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 32: 343–350, 2010.

HEIDE, O. M.; PRESTRUD, A. K. Low temperature, but not photoperiod, controls growth cessation and dormancy induction and release in apple and pear. *Tree physiology*. 25(1): 109–114, 2005.

HORVATH, D. Common mechanisms regulate flowering and dormancy. *Plant Science*. 177(6): 523–531, 2009.

HORVATH, D. P.; ANDERSON, J. V.; CHAO, W. S.; FOLEY, M. E. Knowing when to grow: Signals regulating bud dormancy. *Trends in Plant Science*. 8(11): 534–540, 2003.

JACKSON, J. E. Biology of apples and pears. Cambridge: Cambridge University Press, 2003.

KURIEN, B.; SCOFIELD, R. Western blotting. *Methods*. 38(4): 283–293, 2006.

LANG, G. A.; EARLY, J. D.; MARTIN, G. C.; DARNELL, R. L. Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *Hortscience*. 22(3): 371–377, 1987.

LUEDLING, E.; BROWN, P. H. A global analysis of the comparability of winter chill models for fruit and nut trees. *International Journal of Biometeorology*. 55(3): 411–421, 2011.

MACPHEE, D. J. Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 61(2): 171–177, 2010.

MAHMOOD, T. & YANG, P. C. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 4(9): 429–434, 2012.

MURPHY, R. M.; LAMB, G. D. Important considerations for protein analyses using antibody based techniques: down-sizing Western blotting up-sizes outcomes. *The Journal of physiology*. 591(23): 5823–31, 2013.

NISHIZAWA, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology*. 147(3): 1251–1263, 2008.

OR, E.; NIR, G.; VILOZNY, I. Timing of hydrogen cyanamide application to grapevine buds. *Vitis*. 38(1): 1–6, 1999.

PALLADINI, L. A.; PETRI, J. L. Eficiência de diferentes volumes e concentrações de calda para quebra de dormência na macieira cultivar “Gala”. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 34(8): 1491–1495, 1999.

PETERBAUER, T.; MACH, L.; MUCHA, J.; RICHTER, A. Functional expression of a cDNA encoding pea (*Pisum sativum* L.) raffinose synthase, partial purification of the enzyme from maturing seeds, and steady-state kinetic analysis of raffinose synthesis. *Planta*. 215(5): 839–846, 2002.

PETRI, J. L.; LEITE, G. B.; COUTO, M.; FRANCESCOTTO, P. Avanços na cultura da macieira no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Volume Esp: 48–56, 2011.

PETTERLE, A.; KARLBERG, A.; BHALERAO, R. P. Daylength mediated control of seasonal growth patterns in perennial trees. *Current Opinion in Plant Biology*. 16(3): 301–306, 2013.

RECH, S.; CARIO, S. A. F.; AUGUSTO, C. A. Avaliação conjuntural da produção e comercialização da maçã em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul: aspectos comparativos. *Indicadores Econômicos FEE*. 42(1): 89–106, 2014.

RENAUT, J.; HAUSMAN, J. F.; BASSETT, C.; ARTLIP, T.; CAUCHIE, H. M.; WITTERS, E.; WISNIEWSKI, M. Quantitative proteomic analysis of short photoperiod and low-temperature responses in bark tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Tree Genetics & Genomes*. 4(4): 589–600, 2008.

ROHDE, A. & BHALERAO, R. P. Plant dormancy in the perennial context. *Trends in Plant Science*. 12(5): 217–223, 2007.

SANTAMARÍA, M. E.; RODRÍGUEZ, R.; CAÑAL, M. J.; TOOROP, P. E. Transcriptome analysis of chestnut (*Castanea sativa*) tree buds suggests a putative role for epigenetic control of bud dormancy. *Annals of Botany*. 108(3): 485–498, 2011.

SENGUPTA, S.; MUKHERJEE, S.; BASAK, P.; MAJUMDER, A. L. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Frontiers in Plant Science*. 6: 1–11, 2015.

SENGUPTA, S.; MUKHERJEE, S.; PARWEEN, S.; MAJUMDER, A. L. Galactinol synthase across evolutionary diverse taxa: Functional preference for higher plants? *FEBS Letters*. 586(10): 1488–1496, 2012.

- SMITH, P. T.; KUO, T. M.; CRAWFORD, C. G. Purification and characterization of galactinol synthase from mature zucchini squash leaves. *Plant physiology*. 96(3): 693–8, 1991.
- SUN, Z.; QI, X.; WANG, Z.; LI, P.; WU, C.; ZHANG, H.; ZHAO, Y. Overexpression of *TsGOLS2*, a galactinol synthase, in *Arabidopsis thaliana* enhances tolerance to high salinity and osmotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*. 69: 82–89, 2013.
- TAJI, T.; OHSUMI, C.; IUCHI, S.; SEKI, M.; KASUGA, M.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 29(4): 417–426, 2002.
- TROGGIO, M.; GLEAVE, A.; SALVI, S.; CHAGNÉ, D.; CESTARO, A.; KUMAR, S.; CROWHURST, R. N.; GARDINER, S. E. Apple, from genome to breeding. *Tree Genetics and Genomes*. 8(3): 509–529, 2012.
- VÂLCU, C. M.; SCHLINK, K. Reduction of proteins during sample preparation and two-dimensional gel electrophoresis of woody plant samples. *Proteomics*. 6(5): 1599–1605, 2006.
- VALLURU, R. & VAN DEN ENDE, W. Myo-inositol and beyond - Emerging networks under stress. *Plant Science*. 181(4): 387–400, 2011.
- VÉLEZ-BERMÚDEZ, I. C. & SCHMIDT, W. The conundrum of discordant protein and mRNA expression. Are plants special? *Frontiers in plant science*. 5(11): 619, 2014.
- VOGEL, C.; MARCOTTE, E. M. Insights into regulation of protein abundance from proteomics and transcriptomics analyses. *Nature reviews genetics*. 13(4): 227–232, 2013.
- WANG, L.; ZHANG, L.; MA, C.; XU, W. P.; LIU, Z. R.; ZHANG, C. X.; MATTHEW, W. D.; WANG, S. P. Impact of chilling accumulation and hydrogen cyanamide on floral organ development of sweet cherry in a warm region. *Journal of Integrative Agriculture*. 15(11): 2529–2538, 2016.
- WU, X.; XIONG, E.; WANG, W.; SCALI, M.; CRESTI, M. Universal sample preparation method integrating trichloroacetic acid/acetone precipitation with phenol extraction for crop proteomic analysis. *Nature protocols*. 9(2): 362–74, 2014.
- ZHENG, Q.; SONG, J.; DONCASTER, K.; ROWLAND, E.; BYERS, D. M. Qualitative and quantitative evaluation of protein extraction protocols for apple and strawberry fruit suitable for two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(5): 1663–1673, 2007.
- ZHOU, J.; YANG, Y.; YU, J.; WANG, L.; YU, X.; OHTANI, M.; KUSANO, M.; SAITO, K.; DEMURA, T.; ZHUGE, Q. Responses of *Populus trichocarpa* galactinol synthase genes to abiotic stresses. *Journal of Plant Research*. 127(2): 347–358, 2014.
- ZHUANG, W. B.; SHI, T.; GAO, Z. H.; ZHANG, Z.; ZHANG, J. Y. Differential

expression of proteins associated with seasonal bud dormancy at four critical stages in Japanese apricot. *Plant Biology*. 15(1): 233–242, 2013.

ZUTHER, E.; BÜCHEL, K.; HUNDERTMARK, M.; STITT, M.; HINCHA, D. K.; HEYER, A.G. The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 576(1–2): 169–173, 2004.

## 7 ANEXO A

Tabela A1 Tampão de amostra.

Reagente	Concentração final
Glicerol	10%
Tris-HCl pH 7	50 mM
SDS	2%
Azul de bromofenol	0,02%
2-Mercaptoetanol	1%
Água ultrapura	Para completar o volume final

Tabela A2 Gel concentrador (de entrada). A poliácridamida utilizada foi uma solução contendo 40% de acrilamida e 3% de bisacrilamida (GE Healthcare Life Sciences).

Reagente	Volume (para 1 gel)
Água destilada	1,635 mL
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	0,625 mL
SDS 10%	25 µL
Solução de Acrilamida:Bisacrilamida (40%:3%)	0,240 mL
Persulfato de amônio 10%	50 µL
TEMED	5 µL

Tabela A3 Componentes do gel de corrida.

Reagente	Volume (para 1 gel)
Água destilada	2,175 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,25 mL
SDS 10%	50 µL
Solução de Acrilamida:Bisacrilamida (40%:3%)	1,5 mL
Persulfato de amônio 10%	25 µL
TEMED	5 µL

**Tabela A4 Componentes do tampão de corrida Tris-Glicina.** Caso o pH final não seja 8,3, deve ser ajustado.

Reagente	Concentração final
Tris-HCl pH 8,3	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	1%
Água destilada	Para completar o volume final

**Tabela A5 Componentes da solução corante.**

Reagente	Concentração final
Coomassie Brilliant Blue	0,1%
Metanol	50%
Ácido acético	10%
Água destilada	40%

**Tabela A6 Componentes da solução descorante.**

Reagente	Concentração final
Metanol	40%
Ácido acético	10%
Água destilada	50%

**Tabela A7 Componentes do tampão de transferência úmida.**

Reagente	Concentração final
Tris	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol	20%
Água destilada	Para completar o volume final

**Tabela A8 Componentes do tampão TBS.** O pH foi ajustado para 7,6 com HCl concentrado.

Reagente	Concentração final
Tris pH 7,6	20 mM
NaCl	150 mM
Água destilada	Para completar o volume final

## 8 APÊNDICE A

### **Comparison of protein extraction protocols for terminal apple buds**

*Manuscrito a ser submetido ao periódico 'Plant Methods' (FI 2017: 3,510)*



1 **Comparison of protein extraction protocols for terminal apple buds**

2 Patrícia R. D. Picolotto<sup>1,2</sup>, Giancarlo Pasquali<sup>1</sup> and Luís F. Revers<sup>2\*</sup>

3 **Author details**

4 1 Graduate Program in Cell and Molecular Biology – Centro de Biotecnologia,  
5 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 91501-970,  
6 Brazil

7 2 Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, 95701-008, Brazil

8 **\* Corresponding author**

9 Dr. Luís Fernando Revers

10 Laboratory of Plant Molecular Genetics, Embrapa Uva e Vinho, Rua Livramento,  
11 515, P.O. Box 130, 95701-008, Bento Gonçalves, RS, Brazil

12 **Tel:** +55 54 3455 8034

13 **Fax:** +55 54 3455 8127

14 **E-mail:** [luis.revers@embrapa.br](mailto:luis.revers@embrapa.br)

## 15 **Abstract**

16 **Background:** Apple (*Malus x domestica* Borkh.) is the fourth most economically  
17 important fruit in the world. Its production depends on bud dormancy, a process that  
18 is regulated by environmental conditions such as chilling temperatures. The study  
19 of the dormancy process became more important with the global warming projection  
20 and the perspective of a drastic reduction in temperate fruit production. Proteomic  
21 approaches and genetic and molecular methodologies are important tools that may  
22 help to understand and to control dormancy for silvicultural purposes. For  
23 proteomics studies in perennial crops, reliable and effective protein extraction  
24 procedures are essential giving the chemical complexity of the lignified tissues.

25

26 **Results:** In this study, we compared five different protocols for protein extraction  
27 using closed terminal apple buds from 'Gala' cultivar, adapting them to be processed  
28 in 1.5 mL-capped microtubes. Although protocols 1, 2 and 3, based on TCA/acetone  
29 precipitation, resulted in higher amounts of total proteins, protein diversity was more  
30 limited based on the number of bands visualized after SDS-PAGE analysis. A  
31 protocol based on SDS precipitation and hot temperatures (Protocol 4) resulted in  
32 lower amounts of total protein, but higher number of bands after SDS-PAGE  
33 analysis. A protocol employing phenol extraction (Protocol 5) also resulted in lower  
34 quantities of proteins, although different weight patterns of bands were visible in  
35 PAGE when compared to the other methods.

36

37 **Conclusion:** The protein extraction protocols tested in the present work yielded  
38 sufficient amounts of proteins from apple terminal buds, with various patterns of  
39 protein profile after analysis of SDS-PAGE. In this study, the most efficient protocol  
40 for a proteomic study was number 3, due to the protein concentration in the final  
41 extract and the number of bands visible in PAGE.

42 **Keywords:** Apple, dormancy, protein extraction, closed terminal buds, proteomic  
43 study.

44

## 45 **Background**

46

47 Apple (*Malus x domestica* Borkh.) is one of the most cultivated fruit trees in the world  
48 and the fourth most economically important following citrus, grape and banana [1].  
49 Apple production is closely related to bud dormancy and a well-adjusted dormancy  
50 cycle is essential for the achievement of its full genetic potential. This process is  
51 regulated by environmental conditions such as chilling temperatures and  
52 photoperiodic changes, required for dormancy entrance and release [2]. Dormancy  
53 is usually divided into three types: (i) paradormancy, the inhibition of growth by distal  
54 organs; (ii) endodormancy, the inhibition of growth by internal bud signals; and (iii)  
55 ecodormancy, the inhibition of growth by temporary unfavorable environmental  
56 conditions [3]. Dormancy entrance is characterized by growth cessation, bud set  
57 and leaf senescence. When dormant, plants do not resume growth until a certain  
58 amount of winter chill (temperatures below 7.2 °C) is accumulated, fulfilling their  
59 chilling requirement [4]. The mechanisms regulating dormancy release are highly  
60 heritable and finely tuned. Each genotype is strongly influenced by its region of  
61 origin, suggesting a strong genetic control of this trait [2]. Although dormancy is a  
62 process through which plants adapt their phenology to the environment, rapid  
63 climatic changes might overcome the adaptability of many temperate fruit crops in  
64 the near future [5]. The projected thermal changes may modify the physiological and  
65 reproductive cycles of each species, anticipating phenological timings such as  
66 budburst, flowering and maturation, with ultimate implications on yields and fruit  
67 quality attributes [6,7]. Therefore, the study of the dormancy process became even  
68 more important within the context of this predictions and proteomics approaches,  
69 along with other physiological, genetic and molecular tools, need to be applied in  
70 order to better understand the biology of this process. Establishing a reliable and  
71 effective protein extraction procedure is an essential step in conducting proteomics  
72 research. In the present study, we compared five different protein extraction  
73 protocols using closed terminal apple buds from the 'Gala' cultivar. Protocols were  
74 chosen based on their extraction methods: using TCA/acetone precipitation  
75 (Protocols 1, 2 and 3, with variations among them); other with SDS precipitation and  
76 hot temperatures (Protocol 4); and, lastly, one employing phenol extraction (Protocol

77 5). All protocols were adapted to be performed in 1,5 ml-capped microtubes,  
78 therefore employing lower amounts of tissues. Besides the simplification of  
79 methods, this approach is especially useful for comparative proteomics analyses  
80 that require many samples and replicas for statistical-based conclusions. Final  
81 protein extracts were analyzed on their quality, with SDS-PAGE and on quantity, by  
82 Bradford Reagent.

83

## 84 **Materials and methods**

85

### 86 **Plant material and tissue disruption**

87

88 Plant material was obtained from a commercial orchard located in Monte Castelo,  
89 Santa Catarina, in Southern Brazil (26° 37' 39" S, 50° 14' 7.73" W and 791 m  
90 altitude). Closed terminal buds were harvested from two 'Gala Standard' trees in  
91 mid-Winter, when plants were fully dormant. All apple plants were adult trees and  
92 underwent standard orchard management practices. Samples were immediately  
93 frozen in liquid nitrogen in the field and stored at -80 °C until use. Closed buds were  
94 ground into a fine powder in liquid nitrogen with precooled mortar and pestle.  
95 Approximately 200 mg of powder were used in 0.5 or 1 mL of extraction buffer. All  
96 operations were carried out on ice unless differently specified in protocols.

97

### 98 **Protein extraction**

99

#### 100 **Protocol 1 (based in Damerval *et al.*, 1986)**

101 Tissue powder (around 200 mg) was suspended in 0.5 or 1.0 mL of a solution of  
102 10% trichloroacetic acid (TCA) in cold acetone with 0.07%  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -  
103 ME) in 1.5 mL microfuge tubes. Proteins were allowed to precipitate for 45 min at -  
104 18 °C. Extracts were further centrifuged at 30,000 g for 15 min at 4 °C. After

105 discarding supernatants precipitates were rinsed with cold acetone containing  
106 0.07%  $\beta$ -ME for 1 h at  $-18^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was discarded and protein  
107 precipitates were dried under vacuum. Dried samples were dissolved in 150  $\mu\text{L}$  of  
108 lysis buffer [7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS and 20 mM DTT] and incubated  
109 overnight at room temperature (RT) with continual shaking. The supernatant was  
110 collected after centrifugation at 15,000 g for 30 min and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . [8]

111

### 112 **Protocol 2 (based in Renaut *et al.*, 2008)**

113

114 Tissue powder (around 200 mg) in 1.5 mL microfuge tubes was resuspended in 0.5  
115 or 1.0 mL of a solution of 20% TCA in cold acetone with 0.1% DTT and kept at  $-20$   
116  $^{\circ}\text{C}$  overnight. Tubes were centrifuged at 30,000 g for 45 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Protein  
117 precipitates were washed with ice-cold acetone containing 0.1% DTT and  
118 centrifuged again at  $4^{\circ}\text{C}$ . This step was repeated three times, and precipitates were  
119 dried under vacuum. Dried samples were dissolved in 150  $\mu\text{L}$  of lysis buffer and  
120 incubated overnight at RT with continual shaking. The supernatant was collected  
121 after centrifugation at 15,000 g for 30 min and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . [9]

122

### 123 **Protocol 3 (based in Zhuang *et al.*, 2013)**

124

125 Tissue powder (around 200 mg) in 1.5 mL microfuge tubes was resuspended in 0.5  
126 or 1.0 mL of a solution of 10% TCA in cold acetone with 0.1% DTT and then  
127 precipitated overnight at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Tubes were then centrifuged at 15,000 g for 30 min  
128 at  $4^{\circ}\text{C}$ . Protein precipitates were washed with cold acetone containing 0.1% DTT  
129 and centrifuged again at 15,000 g for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The washing steps were  
130 repeated until the supernatant was colorless. Precipitates were further dried under  
131 vacuum. Dried samples were dissolved in 150  $\mu\text{L}$  of lysis buffer and incubated  
132 overnight at RT with continual shaking. The supernatant was collected after  
133 centrifugation at 15,000 g for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . [10]

134

135 **Protocol 4 (based in Zheng *et al.*, 2007 I)**

136

137 Tissue powder (around 200 mg) in 1.5 mL microfuge tubes was resuspended in 0.5  
138 or 1.0 mL of SDS extraction buffer [2% SDS, 60 mM DTT, 20% glycerol, 40 mM  
139 Tris-HCl pH 8.5] and incubated for 8 min at 90-94°C. Incubated samples were  
140 centrifuged at 8,000 g for 15 min at 4 °C. The resulting supernatant was mixed with  
141 four volumes of precipitation solution [10% TCA and 20 mM DTT in cold acetone],  
142 incubated at -20 °C for 45 min, and then centrifuged at 18,000 g for 10 min at 4 °C.  
143 The resulting protein precipitate was washed three times with a solution of 20 mM  
144 DTT in cold acetone and then centrifuged at 20,000 g for 10 min at 4 °C. Washed  
145 precipitates were dried under vacuum, rehydrated in 150 µL of lysis buffer and  
146 incubated overnight at RT with continual shaking. The supernatant was collected  
147 after centrifugation at 12,000 g for 10 min at RT and stored at -20 °C. [11]

148

149 **Protocol 5 (based in Zheng *et al.*, 2007 II)**

150

151 Ground tissue (around 200 mg) in 1.5 mL microfuge tubes was resuspended in 1  
152 mL of phenol extraction buffer [0.7 M sucrose, 0.1 M KCl, 0.5 M Tris-HCl pH 8.5, 50  
153 mM EDTA pH 8.5, 1% PVPP and 40 mM DTT] and incubated on ice for 10 min. The  
154 resulting homogenate was incubated with gentle shaking with an equal volume of  
155 Tris-HCl-saturated phenol (pH 8.0) for 10 min and then centrifuged at 10,000 g for  
156 15 min at 4 °C. The upper phenol phase was collected, and the pellet was re-  
157 extracted once as above. The pooled phenol phases were mixed well with 4  
158 volumes of 10% TCA and 20 mM DTT in cold acetone and incubated overnight at -  
159 20 °C. Incubated samples were further centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4 °C.  
160 The resulting protein precipitates were washed three times with cold acetone  
161 containing 20 mM DTT. Washed precipitates were dried under vacuum, rehydrated  
162 in 150 µL of lysis buffer and incubated overnight at RT with continual shaking. The

163 supernatant was collected after centrifugation at 12,000 g for 10 min at RT and  
164 stored at -20 °C. [11]

165

### 166 **Protein quantification**

167

168 Protein content was estimated by the Bradford assay [12] using Bradford reagent  
169 (Sigma Aldrich). Protein quantification was performed according to the  
170 manufacturer's instructions. Protein standards were prepared in triplicates in buffer  
171 ranging from 0-1.4 mg/mL using BSA standard in triplicates.

172

### 173 **SDS-PAGE**

174

175 A volume of 4  $\mu$ L of 4x sample buffer [10% glycerol, 50 mM Tris-HCl, 2% SDS,  
176 0.02% bromophenol blue and 1%  $\beta$ -ME] was added to every 16  $\mu$ L of protein extract  
177 samples in 0.5 mL microfuge tubes. After mixing by pipetting, samples were quickly  
178 centrifuged and then incubated at RT for 30 min. A 10- $\mu$ L aliquot of each sample  
179 was electrophoresed in 0.75 mm-thick SDS-PAGE containing 12% polyacrylamide  
180 (acrylamide 40% and bis-acrylamide 3%). A Tris-Glycine buffer [25 mM Tris-HCl,  
181 192 mM glycine and 1% SDS] was used as electrophoresis buffer. Gels were run at  
182 85 V for 30 min and at 135 V until the bromophenol blue band reached the bottom  
183 of the gel. Gels were then incubated into Coomassie Brilliant Blue staining solution  
184 and kept for 2-3 h on seesaw shaker at RT. Gels were further de-stained in a solution  
185 of 40% methanol and 10% acetic acid on seesaw shaker at RT. The de-staining  
186 solution was changed two to three times.

187

### 188 **Results and discussion**

189

190 In order to achieve an optimal procedure for protein extraction from closed terminal  
 191 apple buds and study bud dormancy via proteomics approaches, we tested the yield  
 192 of five different methods. All protocols were adapted to 1.5 mL microfuge tubes with  
 193 around 200 mg of frozen, ground tissue as starting materials. It is well known that  
 194 the efficiency of protein extraction from plant tissues depends on the effectiveness  
 195 of the cell wall disruption and protein release [13]. In order to perform all protocols  
 196 tested in the present work, the closed terminal apple buds were pulverized to a fine  
 197 powder in mortars with pestles in the presence of liquid nitrogen to minimize  
 198 proteolysis. When tissue powders were initially suspended in 1 mL extraction buffer  
 199 instead of 0.5 mL, all protocols (but Protocol 4) resulted in higher amounts of total  
 200 proteins. The protein yields of the protocols tested are summarized in Table 1. It  
 201 became clear that protocols 2 and 3 with an initial suspension of ground tissues in  
 202 1.0 mL of the extraction buffers yielded the highest amounts of proteins (above 4  
 203  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ).

204

205 Table 1 Protein quantification using Bradford Reagent of resulting protein extracts from closed  
 206 terminal apple buds obtained by five different protocols and different initial extraction buffer volumes  
 207 and time of incubation. Number of bands were analyzed using GelAnalyzer Software. It was used a  
 208 BSA standard curve with a  $R^2$  of 0.9932.

Protein Extraction Protocol	Initial Volume of Extraction Buffer (mL)	Incubation in Extraction Buffer	Total Protein Concentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Number of visible bands in SDS-PAGE
1	0.5	45 min	1.62	13
1	1.0	45 min	3.31	13
2	0.5	Overnight	2.87	14
2	1.0	Overnight	4.17	21
3	0.5	Overnight	2.51	16
3	1.0	Overnight	4.68	20
4	0.5	45 min	2.42	18
4	1.0	45 min	2.16	18
5	1.0	2 x 10 min	0.22	20



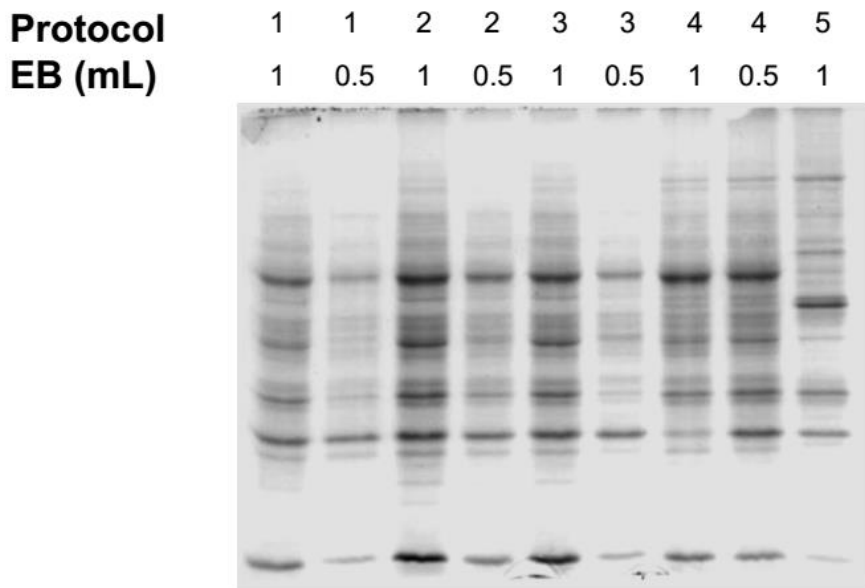
209

210 The quality of each protein extract was verified by SDS-PAGE (Figure 1) and no  
211 protein degradation was observed. Protocols 2 and 3 resulted in protein extracts  
212 that exhibited similar patterns of protein bands, showing that there was a small or  
213 no difference in protein diversity extracted using different TCA concentrations (10%  
214 or 20%). The reduction in precipitation time (Protocol 1) resulted in a decrease of  
215 protein bands observed, when compared to Protocols with the same extraction  
216 methods (2 and 3) (Table 1). Methods based on TCA precipitation were already  
217 shown to be the most efficient for protein extraction from plant tissues due to a better  
218 inhibition of proteases, and protease inhibitors are usually not required during  
219 extraction [14]. It has been shown that subsequent solubilization of proteins in  
220 buffers containing urea was not accompanied by any reactivation of proteases when  
221 TCA extraction buffers are employed [15].

222 SDS extraction combined to 10% TCA extraction buffer (Protocol 4) is being used  
223 for total protein extraction from different plant organs and tissues with considerable  
224 success [11,16–19]. It has been reported that the high protein binding ability of SDS,  
225 especially at the elevated temperature of 95 °C, improves the solubilization of  
226 membrane proteins and the recovery of soluble proteins. Additionally, hot SDS is  
227 capable of inhibiting protease activity during cell disruption and protein extraction  
228 [18]. Nevertheless, SDS extraction (Protocol 4) resulted in low amounts of proteins  
229 when compared to Protocols 1, 2 and 3. Also, when analyzed using GelAnalyzer  
230 Software, the diversity of proteins extracted with the employment of Protocol 4 was  
231 similar to Protocols 2 and 3 (Figure 1).

232 When employing phenol extraction, proteins are first extracted in an aqueous buffer  
233 and then mixed with the buffered phenol. This causes protein to denature and to  
234 dissolve in the phenol phase, whereas other water-soluble substances like salts,  
235 nucleic acids and carbohydrates remain in the aqueous phase. Coextracted  
236 phenolic substances are then separated from proteins after a TCA/acetone  
237 precipitation [13]. The employment of such a method (Protocol 5) didn't result in  
238 appreciable amounts of proteins (Table 1) probably due to the low phenol volume  
239 used and, consequently, the difficulty in collecting only the phenol phase. Despite

240 that, different proteins were extracted using this protocol when compared to the  
 241 other extracts. Based on SDS-PAGE analysis, it was reasonable to conclude that  
 242 Protocols 2, 3 and 4 allowed the extraction of a higher diversity of proteins based  
 243 on the number of protein bands visible in gels. Furthermore, Protocol 3 yielded  
 244  
 305



306

307 Figure 1 SDS-PAGE separation of resulting proteins from closed terminal apple buds from 'Gala'  
 308 cultivar after extraction by five different protocols. 1 – protein extract obtained using protocol based  
 309 in Damerval *et al.*, 1986; 2 - protein extract obtained using protocol based in Renaut *et al.*, 2008; 3  
 310 - protein extract obtained using protocol based in Zhuang *et al.*, 2013; 4 and 5: protein extracts  
 311 obtained using protocols based in Zheng *et al.*, 2007. EB: volumes (1 mL or 0.5) of Extraction  
 312 Buffers employed.

313

### 314 Conclusion

315 Five different protocols for protein extraction adapted to 1.5 mL microfuge tubes  
 316 were compared using closed terminal apple bud tissues in order to define the most  
 317 promising one. Our data allowed us to conclude that Protocols 2 and 3, employing  
 318 1 mL of TCA-based extraction buffers at concentrations of 20 or 10% allowed the  
 319 recovery of larger amounts of proteins with a reasonable diversity of proteins.  
 320 Notwithstanding, Protocol 4 that preconizes the use of 0.5 mL SDS extraction buffer  
 321 combined to 10% TCA extraction buffer allowed us to recover a higher diversity of

322 proteins based on the number of protein bands visible after SDS-PAGE gels,  
323 although in lower amounts. The right protocol choice for extracting proteins from  
324 closed terminal apple buds will depend on the protein of interest since different  
325 proteins were extracted using the tested protocols.

326

## 327 **Declarations**

### 328 **Ethics approval and consent to participate**

329 Not applicable.

### 330 **Consent for publication**

331 Not applicable.

### 332 **Availability of data and material**

333 All data generated or analyzed during this study are included in this published  
334 article.

### 335 **Competing interests**

336 The authors declare that they have no competing interests.

## 337 **Funding**

338 This work was supported by 'Financiadora de Estudos e Projetos' (FINEP, Brazil;  
339 grant number 0107009700) and Embrapa (Brazil; grant number  
340 02.12.12.003.00.02). PRDP received a master's scholarship from 'Coordenação de  
341 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior' (CAPES, Ministry of Education,  
342 Brazil). GP is recipient of research fellowships from 'Conselho Nacional de  
343 Desenvolvimento Científico e Tecnológico' (Ministry of Science, Technology and  
344 Innovation, Brazil, grant numbers 309869/2012-9).

## 345 **Authors' contributions**

346 PRDP designed and performed all the experiments, and wrote the manuscript. LFR  
347 designed all experiments and performed field sampling; GP and LFR supervised the  
348 experiments. All authors read and approved the final manuscript.

349

350 **References**

- 351 1. Troggio M, Gleave A, Salvi S, Chagné D, Cestaro A, Kumar S, et al. Apple, from  
352 genome to breeding. *Tree Genet. Genomes*. 2012;8:509–29.
- 353 2. Falavigna V da S, Porto DD, Silveira CP, Revers LF. Recent Advances in  
354 Genetics and Molecular Control of Bud Dormancy in Pipfruits. *Adv. Plant Dormancy*.  
355 Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 107–22.
- 356 3. Lang GA, Early JD, Martin GC, Darnell RL. Endo-, para-, and ecodormancy:  
357 physiological terminology and classification for dormancy research. *Hortscience*.  
358 1987;22:371–377.
- 359 4. Luedeling E, Brown PH. A global analysis of the comparability of winter chill  
360 models for fruit and nut trees. *Int. J. Biometeorol*. 2011;55:411–21.
- 361 5. Campoy JA, Ruiz D, Egea J. Dormancy in temperate fruit trees in a global  
362 warming context: A review. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. Elsevier B.V.; 2011;130:357–  
363 72.
- 364 6. Santos JA, Costa R, Fraga H. Climate change impacts on thermal growing  
365 conditions of main fruit species in Portugal. *Clim. Change. Climatic Change*;  
366 2016;1–14.
- 367 7. Kirtman B, Adedoyin A, Bindoff N. Near-term Climate Change: Projections and  
368 Predictability. *Notes*. 2012;953–1028.
- 369 8. Damerval C, De Vienne D, Zivy M, Thiellement H. Technical improvements in  
370 two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in  
371 wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*. 1986;7:52–4.
- 372 9. Renaut J, Hausman J-F, Bassett C, Artlip T, Cauchie H-M, Witters E, et al.  
373 Quantitative proteomic analysis of short photoperiod and low-temperature  
374 responses in bark tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Tree Genet*.  
375 *Genomes*. 2008;4:589–600.
- 376 10. Zhuang W-B, Shi T, Gao Z-H, Zhang Z, Zhang J-Y. Differential expression of  
377 proteins associated with seasonal bud dormancy at four critical stages in Japanese  
378 apricot. *Plant Biol*. 2013;15:233–42.
- 379 11. Zheng Q, Song J, Doncaster K, Rowland E, Byers DM. Qualitative and  
380 quantitative evaluation of protein extraction protocols for apple and strawberry fruit  
381 suitable for two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analysis. *J*.  
382 *Agric. Food Chem*. 2007;55:1663–73.
- 383 12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram  
384 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*.  
385 1976;72:248–54.
- 386 13. Wu X, Xiong E, Wang W, Scali M, Cresti M. Universal sample preparation  
387 method integrating trichloroacetic acid/acetone precipitation with phenol extraction

- 388 for crop proteomic analysis. *Nat. Protoc.* 2014;9:362–74.
- 389 14. Vâlcu CM, Schlink K. Reduction of proteins during sample preparation and two-  
390 dimensional gel electrophoresis of woody plant samples. *Proteomics.* 2006;6:1599–  
391 605.
- 392 15. Hari V. A method for the two-dimensional electrophoresis of leaf proteins. *Anal.*  
393 *Biochem.* 1981;113:332–5.
- 394 16. Granier F. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis.  
395 *Electrophoresis.* 1988;9:712–8.
- 396 17. Mu-Forster C, Wasserman BP. Surface Localization of Zein Storage Proteins in  
397 Starch Granules from Maize Endosperm. *Plant Physiol.* 1998;116:1563–71.
- 398 18. Song J, Braun G, Bevis E, Doncaster K. A simple protocol for protein extraction  
399 of recalcitrant fruit tissues suitable for 2-DE and MS analysis. *Electrophoresis.*  
400 2006;27:3144–51.
- 401 19. Timperio AM, Egidi MG, Zolla L. Proteomics applied on plant abiotic stresses:  
402 Role of heat shock proteins (HSP). *J. Proteomics.* 2008;71:391–411.

## 9 CURRICULUM VITAE

**PICOLOTTO, P. R. D**

### **DADOS PESSOAIS**

Nome: Patrícia Regina Dhein Picolotto

Data de nascimento e local: 20/02/1991, Araguaína, TO, Brasil

E-mail: pati.picolotto@gmail.com

### **FORMAÇÃO**

#### Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Título: Estudo do potencial biotecnológico dos genes codificadores de Galactinol Sintases (GoS) como marcadores do processo de ecodormência de gemas em macieira (*Malus x domestica* Borkh.)

Orientador: Dr. Giancarlo Pasquali

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Período: 2015 – 2017

#### Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Título: Expressão de genes codificadores de versões truncadas da urease de *Canavalia ensiformis* em plantas

Orientação: Dr. Giancarlo Pasquali

Período: 2010 – 2014/2

## **ESTÁGIOS**

### Estágio de Iniciação Científica

Laboratório de Biologia Molecular Vegetal – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Projeto: Projeção de gene sintético codificador da glicocerebrosidase humana e adaptação a plasmídeos com vistas à transformação genética de plantas.

Orientação: Dr. Giancarlo Pasquali

Período: 2011/1 – 2012/2

Bolsista de Iniciação Tecnológica Industrial, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

### Estágio de Iniciação Científica Voluntário

Laboratório de Biologia Molecular Vegetal – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Projeto: Expressão de genes codificadores de versões truncadas da urease de *Canavalia ensiformis* em plantas

Orientação: Dr. Giancarlo Pasquali

Período: 2013/1 – 2014/2

## **PRÊMIOS E TÍTULOS**

Proficiência em leitura da Língua Inglesa, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS

Ano: 2015

## **EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL**

Laboratorista na empresa ACTGene Análises Moleculares, Porto Alegre, RS, Brasil.

Atividades Desenvolvidas: Realização de sequenciamentos de DNA a partir de produtos de PCR e plasmídeos, utilizando o equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Responsável pelo recebimento, organização, processamento e envio de resultados.

Período: 2012 – 2015

## **RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS**

PICOLOTTO, P. R. D.; FALAVIGNA, V. S.; PASQUALI, G.; REVERS, L. F. Study of the biotechnological potential use of galactinol synthase (MdGolS) as a marker of the ecodormancy process in apple buds. In: 11h International Congress of Plant Molecular Biology, 2015, Foz do Iguaçu. 11h International Congress of Plant Molecular Biology, 2015.

PICOLOTTO, P. R. D.; PIZZOLI, G.; PASQUALI, G. Design and cloning of the human glucocerebrosidase gene for plant transformation and expression. In: IV Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2013, Bento Gonçalves. IV Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2013.



PICOLOTTO, P. R. D.; PIZZOLI, G.; PASQUALI, G. Design and Cloning of a Synthetic Gene Encoding Human Glucocerebrosidase for the Genetic Transformation of Plants. In: 4º Congresso Brasileiro de Biotecnologia e Rodada de Negócios, 2012, Guarujá. 4º Congresso Brasileiro de Biotecnologia e Rodada de Negócios, 2012.