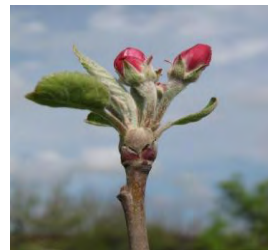


Caracterização da dormência hiberna em gemas de macieira



Henrique Pessoa dos Santos¹
Luís Fernando Revers²
Gabriel Berenhauser Leite³
João Bernardi⁴

1. INTRODUÇÃO

A macieira (*Malus x domestica* Borkh), como outras espécies de clima temperado, apresenta no final do ciclo a queda de folhas e o estabelecimento da dormência hiberna (endodormência). Durante a endodormência, a maioria das cultivares desta espécie necessita de regularidade e intensidade de baixas temperaturas ($> 600\text{h}$, $T \leq 7,2^\circ\text{C}$), para que inicie a brotação e, conseqüentemente, se estabeleça um novo ciclo vegetativo e produtivo (PETRI et al., 2002). Entretanto, em regiões de clima temperado marginais, como a Região Sul do Brasil, mesmo com o emprego de práticas paliativas de manejo para alcançar um padrão adequado de brotação (ex.: tratamento químico), em muitos invernos ocorrem flutuações de temperatura que resultam em grandes quedas de produção (BERNARDES; GODOY, 1988). Estes efeitos são observados principalmente nas cultivares exigentes em frio, como Gala e Fuji, que, coincidentemente, são as de maior valor comercial. Neste cenário, o problema da quebra de dormência tende a ser mais acentuado quando se considera que a região Sul do Brasil está sujeita a aumentos médios de temperatura na ordem de 2°C até 2050, conforme as previsões de mudanças climáticas globais (HULME; SHEARD, 1999; LIMA et al., 2001). Essa é uma preocupação imediata e crescente na fruticultura de clima temperado nacional, pois, considerando-se todos estes cenários, se ações para compreender melhor a dormência e minimizar a dependência elevada de frio hiberna não iniciarem, o Brasil corre o risco de deixar a posição de exportador para o de importador de maçã.

A baixa temperatura é um fator ambiental de grande influência na endodormência de gemas, onde as respostas, em relação às baixas temperaturas, variam de acordo com a idade das gemas e influenciam no crescimento e na

¹ Eng. Agrônomo, Pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, CEP 95700-000, Bento Gonçalves, RS. E-mail: henrique@cnpuv.embrapa.br

² Biólogo, Pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, CEP 95700-000, Bento Gonçalves, RS. E-mail: luis@cnpuv.embrapa.br

³ Eng. Agrônomo, Pesquisador da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina/ EPAGRI/SC, Caixa Postal 591, CEP 89500-000, Caçador, SC. E-mail: gabriel@epagri.sc.gov.br

⁴ Eng. Agrônomo, Pesquisador Aposentado da Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, CEP 95700-000, Bento Gonçalves, RS.

sobrevivência das plantas (CRABBÉ; BARNOLA, 1996). Os processos fisiológicos internos envolvidos na entrada e na saída da endodormência têm sido relacionados com modificações na estrutura celular e no metabolismo energético da gema, como a atividade de enzimas, síntese de nucleotídeos, síntese de proteínas, fluxo de carboidratos, suprimento de nutrientes, translocação de reservas a curta distância e regulação hormonal (STAFSTROM, 2000; MAUREL et al., 2004). Além disso, em alguns estudos da dormência de gemas e até mesmo de sementes, independente da espécie, sempre estão em evidência as espécies reativas de oxigênio (EROs: H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH, etc.) e as enzimas relacionadas à manutenção do estado redox celular (PRASAD, 1996; FAUST et al., 1997; PACEY-MILLER et al., 2003). A tolerância à dessecação, princípio fundamental para estágios quiescentes do desenvolvimento das plantas, também depende de mecanismos para combater radicais livres, como a proteção de grupos tióis em proteínas através de moléculas de glutathione (KRANNER; GRILL, 1996). Com isto, destaca-se também que a cianamida hidrogenada, que é considerada um inibidor da enzima catalase, pode influenciar diretamente na quebra da dormência de gemas, independente da espécie e, portanto, tem sido utilizada no manejo químico paliativo da dormência (PETRI et al., 2002). No conjunto, isto evidencia que o metabolismo oxidativo celular pode ter influência sobre os processos de dormência e, possivelmente, ser um candidato ao mecanismo de controle dos efeitos da temperatura sobre os vários processos relacionados com a dormência. Portanto, a determinação dos níveis de glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pode apresentar-se como uma estratégia de análise para se caracterizar as relações entre o metabolismo oxidativo e a evolução do *status* de endodormência.

Neste cenário, destaca-se que, apesar de se ter conhecimento da ação de diferentes fatores sobre o metabolismo de endodormência, salientando a complexidade e variabilidade desse processo, ainda não se dispõe do conhecimento de como esses fatores se inter-relacionam e o que pode ser classificado como causa ou consequência. Portanto, esta atividade teve como enfoque dar um passo nesse processo, utilizando metodologias de análise de dormência de gemas em uma escala de maior magnitude de detalhes, como a determinação conjunta de metabólitos e a construção de bibliotecas supressivas subtrativas (DIATCHENKO et al., 1996) em gemas de macieiras contrastantes em requerimento de frio.

Os objetivos deste trabalho foram estabelecer relações entre os níveis endógenos de marcadores bioquímicos do metabolismo celular oxidativo com o processo de endodormência de gemas em macieira contrastantes em exigência de frio hibernal, bem como obter bibliotecas de cDNA representando genes diferencialmente expressos, influenciados pelo frio hibernal durante o estabelecimento e a finalização da endodormência.

2. METODOLOGIA

2.1. Material vegetal, amostragem e armazenamento

Em todos os experimentos desta atividade, considerando as análises de metabólitos e expressão gênica, empregaram-se no delineamento experimental as

mesmas amostras de gemas. As avaliações foram conduzidas na Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves, RS, e foram divididas em duas estratégias distintas. Na primeira, foram utilizadas mudas de macieira das cultivares Imperial Gala e seu clone mutante Castel Gala, que apresenta a mutação natural de redução da exigência de frio, no período de inverno (DENARDI; SECCON, 2005). As mudas dessas cultivares foram previamente preparadas pelos pesquisadores Frederico Denardi (Epagri/EECd) e João Bernardi (Embrapa Uva e Vinho), em 2006, sendo enxertadas em porta-enxerto M7 e mantidas em sacos de 3 L com solo corrigido nutricionalmente. Após preparadas, as plantas foram mantidas em casa de vegetação na Embrapa Uva e Vinho, sob os cuidados dos pesquisadores Henrique P. Santos e Luis Fernando Revers (Figura 1). No outono de 2007, as plantas de ambos os genótipos, com aproximadamente 10 gemas cada, foram colocadas em fitotron (2,5 x 3,0 x 2,8 m; com controle de fotoperíodo, de temperatura e de umidade) e submetidas a um regime de temperatura de aproximadamente 1000 horas/7°C. Durante esse período, foram realizadas amostragens de gemas para a análise da evolução da endodormência, conforme metodologia descrita por Balandier (1992) e Herter (1992). Essa análise foi realizada com a colaboração do pesquisador Gabriel Berenhauser Leite (Epagri/EECd). Durante as amostragens, parte das gemas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C até o momento das análises.

Destaca-se que nestas amostragens, pelo efeito de juvenildade, as gemas apresentaram-se extremamente rudimentares (Figura 2). Deste modo, optou-se por não avançar nas análises previstas sobre esse material, pela dificuldade no processamento das pequenas gemas e pelo fato dos resultados serem afetados pela fase de desenvolvimento destas plantas em relação a uma planta adulta com capacidade produtiva.

Na segunda estratégia, foi preconizada a realização de amostragens de gemas de Gala e Castel Gala, em plantas adultas, situadas na propriedade do Eng. Agr. Jânio Seccon, em Monte Castelo, SC (Figura 3). Esta abordagem mostrou-se mais adequada ao estudo proposto porque foi realizada em plantas adultas e em condições naturais de desenvolvimento. Além disso, nessas amostragens utilizaram-se as plantas de Gala que deram origem à mutação Castel Gala.

As amostragens ocorreram em abril, maio, julho, agosto e setembro de 2007, sendo correlacionadas com o início do período da endodormência (abril), com a evolução (maio e julho) e com a saída da dormência da Castel Gala (agosto) e da Gala (setembro). Foram, também, obtidos dados meteorológicos deste mesmo período da região de Monte Castelo junto à Epagri, os quais possibilitaram calcular a disponibilidade de frio e relacioná-la com as variáveis bioquímicas que foram obtidas nas amostras de gemas. Todas essas amostras foram congeladas em nitrogênio líquido no campo (Figura 4) e armazenadas em freezer a -80°C, em Bento Gonçalves, para a realização das análises detalhadas nos experimentos 1 e 2, descritos a seguir.

No segundo ciclo de produção da macieira, na vigência do projeto, foi realizado o segundo período de amostragens de gemas de Gala e Castel Gala, em

plantas adultas, nas mesmas plantas no ciclo anterior, na propriedade do Eng. Agr. Jânio Secon, em Monte Castelo, SC. O contraste de exigência de frio hibernal observado entre Castel Gala e Gala no inverno de 2007 foi igualmente observado no inverno de 2008. As datas de amostragens nos invernos de 2007 e 2008 foram, respectivamente: 29/05/2007, 03/07/08, 13/08/2007 e 27/09/2007 e 20/05/2008, 01/07/2008, 29/07/08 e 17/09/2008. Em razão de diferenças climáticas entre os períodos, a antecipação da brotação da cultivar mutante Castel Gala reflete que o inverno de 2008 foi mais ameno. Foram igualmente obtidos dados meteorológicos do ano de 2008, da região de Monte Castelo, junto à Epagri, os quais foram usados para calcular a disponibilidade de frio que irá então ser relacionada com as variáveis bioquímicas que se obteve nestas amostras de gemas. Todas essas amostras foram armazenadas em freezer a -80°C , na Embrapa Uva e Vinho, para processamento.



Figura 1. Mudas de Gala e Castel Gala enxertadas em porta-enxerto M7. Dezembro/2006. Bento Gonçalves, RS.



Figura 2. Detalhe das gemas das mudas de Gala e Castel Gala, enxertadas em porta-enxerto M7, antes e após tratamento de temperaturas baixas, em fitotron. Julho/2007. Bento Gonçalves, RS.

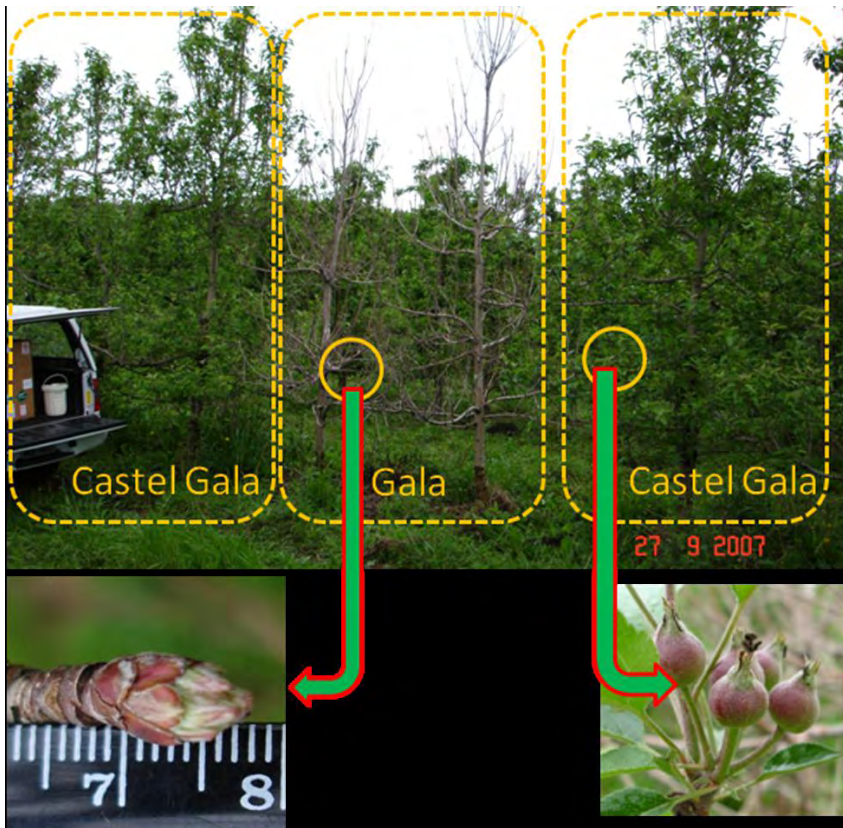


Figura 3. Contraste de exigência de frio hiberna e comportamento fenológico inicial entre as cultivares Gala e Castel Gala no ano de 2007. Na data indicada, enquanto a Castel Gala apresentava frutos de 1,5 cm de diâmetro a Gala apresentava, no máximo, gemas em estágio de ponta-verde.



Figura 4. Detalhe do momento de amostragem de gemas a campo, com congelamento em nitrogênio líquido, em diferentes momentos do período hiberna em pomar comercial das cultivares Gala e Castel Gala. Monte Castelo, SC. 2007.

2.2. Experimento 1. Estabelecimento de relações entre os teores endógenos de marcadores bioquímicos do metabolismo celular oxidativo com o processo de endodormência de gemas em macieira contrastantes em exigência de frio hibernal.

Considerando a importância do metabolismo oxidativo, foram determinados os teores de glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) em gemas dormentes de Gala e Castel Gala, conforme as amostragens descritas acima e de acordo com o protocolo descrito por Kranner (1998). Destaca-se que esse protocolo foi desenvolvido para a quantificação desses compostos em fungos. Portanto, antes de se aplicar em análises diretas com gemas de macieira, foi necessária uma etapa de ajustes, envolvendo dois protocolos, um para glutatona total e outro para glutatona oxidada, sendo por diferença calculada a glutatona reduzida. Os ajustes desses protocolos serão descritos na seção resultados e discussão. O processamento das amostras foi realizado nas dependências da Embrapa Uva e Vinho, mas a análise cromatográfica foi efetuada no Laboratório de Proteínas Tóxicas na UFRGS, sob responsabilidade da professora Célia R. S. Carlini. Análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste de análise de variância não-paramétrica Kruskal-Wallis.

2.3. Experimento 2. Obter bibliotecas de cDNA representando genes diferencialmente expressos, influenciados pelo frio hibernal durante o estabelecimento e a finalização da endodormência.

Para a etapa de extração de RNA total foram utilizadas 10 gemas de esporões de Gala e de Castel Gala na entrada da endodormência (29/05/2007) e na saída da endodormência (13/08/2007), perfazendo, assim, quatro extrações de RNA. A extração de RNA total foi realizada segundo o protocolo modificado de Zeng & Yang (2002), adaptado para escala de purificação de tubos de microcentrífuga de 1,5 a 2,0 mL. Foi realizada a extração em cinco tubos de microcentrífuga que tiveram os seus volumes unidos antes da etapa de precipitação por cloreto de lítio. O RNA mensageiro das diferentes amostras foi purificado a partir de 150 µg de RNA total, utilizando o kit de purificação Poly(A) Purist™ da AMBION. Assim, originaram-se quatro purificados de Gala e Castel Gala na entrada da dormência e na superação da dormência.

O RNA Poly (A) obtido foi a matéria-prima inicial para a obtenção das bibliotecas supressivas subtrativas de cDNA. Utilizou-se o protocolo do PCR-Select™ cDNASubtraction Kit (Clontech) e foram obtidas duas bibliotecas para cada data de coleta, totalizando quatro bibliotecas. A partir destas, foram obtidas bibliotecas supressivas que representam os genes expressos em Gala subtraídos dos genes expressos em Castel Gala na entrada (G1-K1) e na superação (G2-K2) da dormência e os genes expressos em Castel Gala subtraídos dos genes expressos em Gala na entrada (K1-G1) e na superação (K2-G2) da dormência.

3. RESULTADOS

3.1. Padronização do protocolo de determinação de glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) por HPLC, para caracterização bioquímica de gemas de macieira durante dormência hiberna:

Com o intuito de obter uma caracterização bioquímica da dormência hiberna em gemas de macieira e selecionar um marcador bioquímico do metabolismo oxidativo celular, foram realizadas amostragens de gemas dos modelos de macieira contrastantes para o quesito exigência de frio. As cultivares Gala standard e Castel Gala foram coletadas em 2007 e 2008 em pomar comercial de propriedade do Eng. Agr. Jânio Seccon, Monte Castelo, SC, seguindo um delineamento experimental completamente aleatório, em cada árvore, de coleta de gemas em esporões de no máximo 3 cm, independente da idade do ramo. As gemas foram coletadas em grupos individuais por planta, havendo duas e quatro árvores para estudo, respectivamente, das cultivares Gala e Castel Gala. Foram coletadas em média 40 gemas por árvore a cada evento de amostragem. As gemas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido no campo (Figura 4). Esse material serviu de base para a adequação e padronização do protocolo de determinação de glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) por HPLC, descrito por Kranner (1998).

A glutatona é um tripeptídeo, cujo aminoácido central é uma cisteína, portando um grupamento tiol (-SH) quando reduzido, ou formando uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de glutatona quando oxidado. As gemas dormentes de macieira foram trituradas manualmente em almofariz, com auxílio de nitrogênio líquido, e a extração foi realizada em tampão ácido. A partir disso, foram separadas frações do material extraído para dois protocolos paralelos (Figura 5). O protocolo A teve o objetivo de determinar a quantidade de glutatona total em relação a massa fresca dos tecidos da gema submetidos à extração. Para tanto, utilizou-se ditioneitol (DTT) como agente redutor, e a marcação dos tióis livres (i.e., -SH do GSH original ou do GSH formado a partir da quebra de GSSG) foi feita com um fluoróforo específico, o monobromobimano (mBBr). O protocolo B, por sua vez, permitiu a determinação apenas da quantidade de GSSG (glutatona oxidada) presente nas mesmas amostras de gema. Neste protocolo, inicialmente, bloqueou-se os tióis livres do GSH com NEM (N-etil-maleimido), retirou-se seu excesso com lavagens sucessivas de tolueno e, então, as pontes dissulfetos de GSSG foram reduzidas com DTT para se obter os novos grupos -SH passíveis de marcação pelo mesmo fluoróforo mBBr.

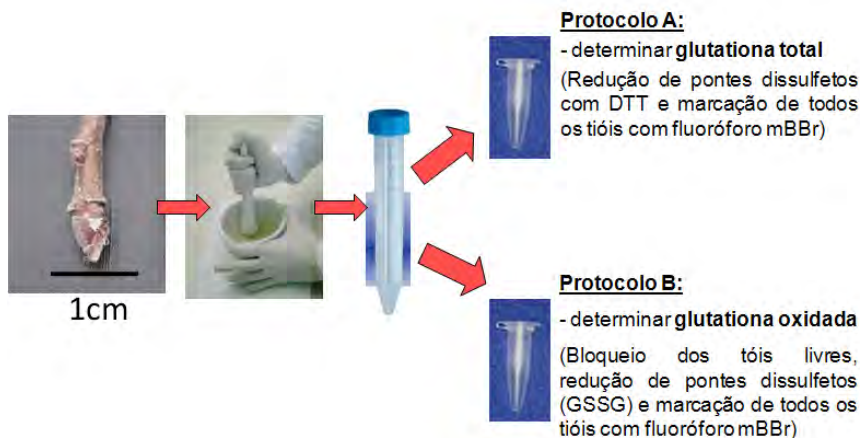


Figura 5. Representação das etapas de preparo das gemas para determinar glutatona total (protocolo A) e oxidada (protocolo B). DTT= ditioneitol; mBBr = monobromobimano.

A padronização do protocolo de extração exigiu várias estratégias e ajustes descritos abaixo:

- ✓ Houve a necessidade de remoção das brácteas lignificadas que envolvem a gema, usando nitrogênio líquido, antes da trituração fina das amostras, pois esses tecidos são altamente oxidados e podem alterar o resultado;
- ✓ Ao contrário do protocolo original, a extração de GSH e GSSG teve que ser efetuada em um tampão que não desestabilizasse as moléculas de interesse a partir de sua forma reduzida ou oxidada originais. Para tanto, foi adicionado EDTA e PVP na solução de extração. O tampão de extração otimizado resultante foi: 0,1M de HCl, 0,5% Triton-X, 1 mM de EDTA e 1,25% de PVP;
- ✓ Para melhor extração dos compostos a partir das gemas, o material foi deixado em meio de extração por 12h, a 4°C;
- ✓ Para reações que devem ser mantidas à temperatura ambiente, estabeleceu-se a temperatura fixa de 25°C;
- ✓ A degaseificação das soluções antes de seu uso foi retirada, pois essa etapa não acrescentou melhoria no processo analítico;
- ✓ Para garantir a estabilidade da amostra, foi aumentada a concentração inicial de CHES (de 200 mM para 300 mM CHES) presente no Tampão CHES;
- ✓ Para forçar uma maior reação dos grupos tióis com o fluoróforo (mBBr), aumentou-se a concentração inicial de DTT (de 3 mM para 20 mM DTT), com sucesso analítico. Na etapa seguinte após a extração, para manutenção da estequiometria, aumentou-se, também, a concentração inicial de NEM utilizada (de 50 mM para 100 mM NEM) na determinação de GSSG;

- ✓ A remoção de NEM e/ou de seus derivados usando tolueno, no protocolo B, é uma das etapas mais demoradas, mas não tem demonstrado interferência na reação da glutationa com o fluoróforo. Para aumentar a eficiência da separação das fases e evitar contaminação com tolueno, acrescentou-se um passo de centrifugação por 2 min entre cada uma das cinco lavagens com tolueno e outra, também, antes de ser transferido o material remanescente para as etapas seguintes;
- ✓ Em vista do custo do fluoróforo utilizado (mBBr, R\$ 367,00/25 mg), testou-se a substituição por OPA (o-ftaldeído). Porém, nos experimentos realizados, este novo fluoróforo demonstrou ser pouco específico em relação à derivatização de grupos tióis. Em função disso, manteve-se o uso do mBBr no protocolo;
- ✓ Para restringir possíveis interferências, foi acrescentado uma etapa de centrifugação e filtração das amostras após marcação nos protocolos e antes destas serem armazenadas em nitrogênio líquido até o momento das análises cromatográficas para quantificação.

Após a marcação com fluoróforo, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) no laboratório da professora Célia Carlini/UFRGS (Figura 6), empregando-se uma separação em modo de fase reversa, em coluna do tipo C18 (ODS), com eluição por gradiente crescente de metanol, e detecção de mBBr por fluorescência (excitação: 380nm/emissão: 480nm). Os ajustes mais significativos nessa fase foram quanto ao gradiente e ao fluxo de eluição da amostra que foram utilizados, para otimizar a resolução dos picos do cromatograma e a diminuição na geração de resíduos (metanol).



Figura 6. Foto do cromatógrafo líquido de alta performance, situado no Laboratório de Proteínas Tóxicas, da professora Célia Carlini/UFRGS, equipado com coluna Shin-pack CLC-ODS (M), Shimadzu, (150mm x 4,6mm, tamanho da partícula de 5 μ m e diâmetro de poro 100 \AA) e coluna guarda Shin-pack, Shimadzu, CLCG-ODS. Programado para um gradiente de eluição de 5% a 90% Metanol, pH 3,9.

Para os ensaios preliminares referentes à padronização do método, foram utilizados padrões do tripeptídeo glutationa, em sua forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG), bem como derivados de sua quebra, o dipeptídeo γ -L-glutamil-L-cisteína (Glu-Cys) e o aminoácido L-cisteína (Cys). Porém, para a determinação de uma curva-padrão para a análise quantitativa das gemas de macieira foram usadas apenas concentrações crescentes do padrão de GSH submetidas ao protocolo A ou do padrão de GSSG submetidas ao protocolo B. Na Figura 7 estão expostas as curvas-padrão estabelecidas para os protocolos A e B.

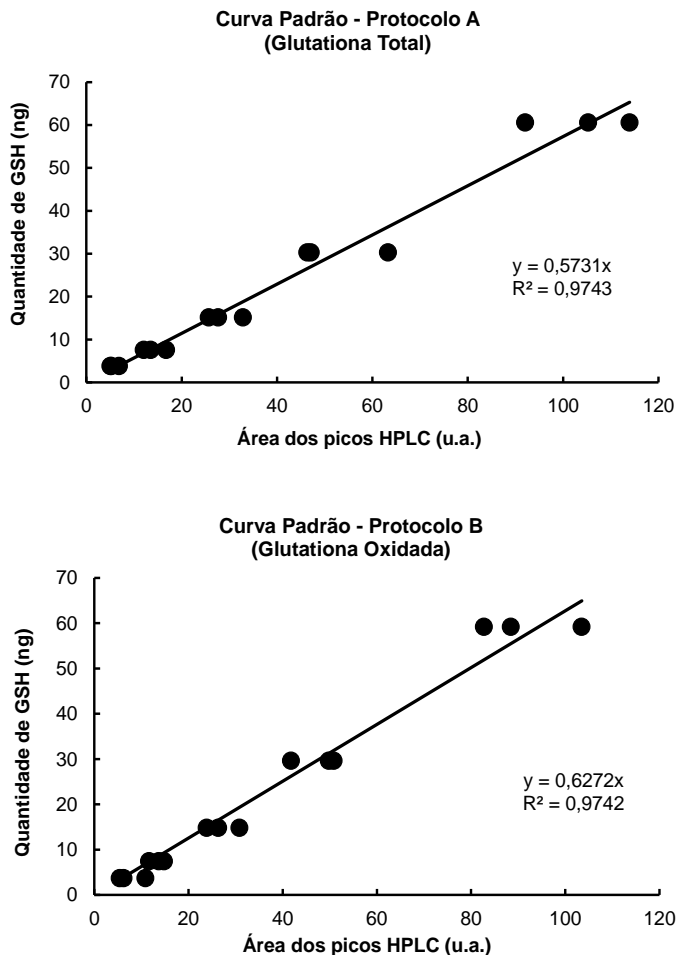


Figura 7. Curvas-padrão construídas de forma independente para os protocolos A ou B, usando triplicatas de amostras em concentrações crescentes dos padrões de glutationa reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG), respectivamente, após processamento segundo o protocolo otimizado, descrito neste trabalho.

3.2. Utilização do protocolo de determinação de glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) por HPLC, para caracterização bioquímica de gemas de macieira durante dormência hiberna:

Gemas de macieiras Royal Gala coletadas em 2007 foram testadas inicialmente para se verificar a adaptação do protocolo a este tipo de tecido biológico e foram obtidos resultados satisfatórios na extração de glutatona bem como na verificação de seu padrão cromatográfico. A Figura 8 apresenta o perfil cromatográfico com a identificação do pico de glutatona em uma amostra de gema de macieira.

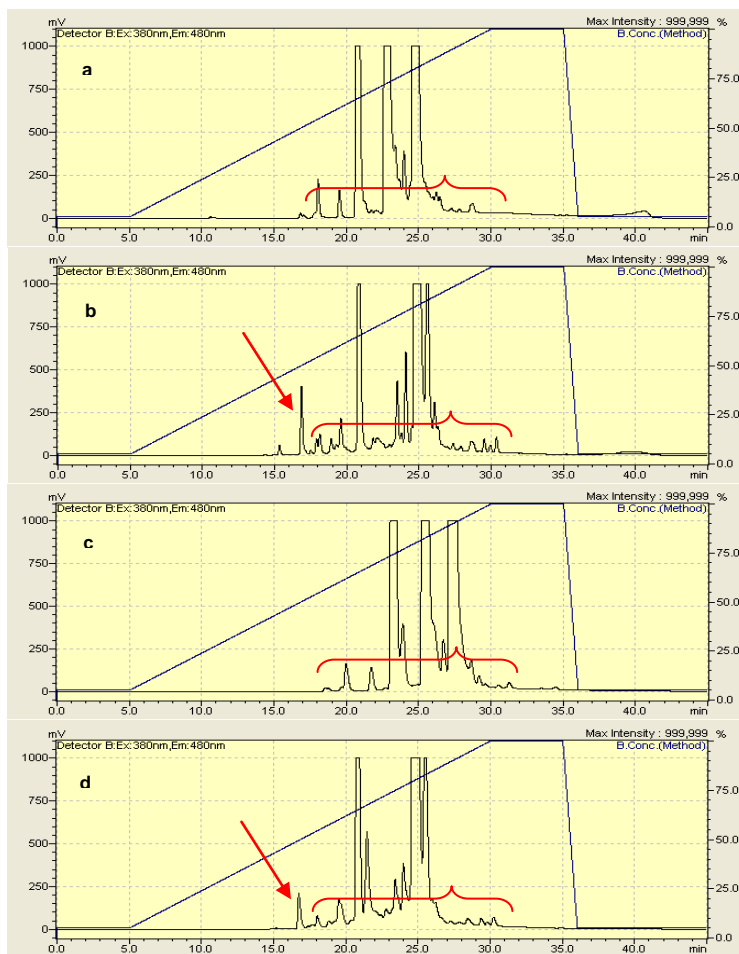


Figura 8. Perfil cromatográfico de amostra de gema de Gala segundo o protocolo A que avalia a quantidade de glutatona total (b), ou protocolo B, referente apenas à quantidade de glutatona oxidada (d), em comparação ao controle dos respectivos protocolos (a) ou (c). Amostra coletada em 13/08/2007 e processada conforme o protocolo otimizado neste trabalho. As setas indicam o pico de glutatona nas amostras. Chaves indicam picos comuns entre controles e amostras.

Nas análises de amostras de gemas coletadas ao longo do período hibernar, foi possível constatar que a concentração de glutatona total e oxidada varia de modo crescente com o acúmulo de horas de frio, em ambas cultivares. Entretanto, destaca-se que em gemas de Castel Gala ocorre uma antecipação, em relação à Gala, no incremento da quantidade de glutatona em relação a massa fresca de gemas (Figura 9).

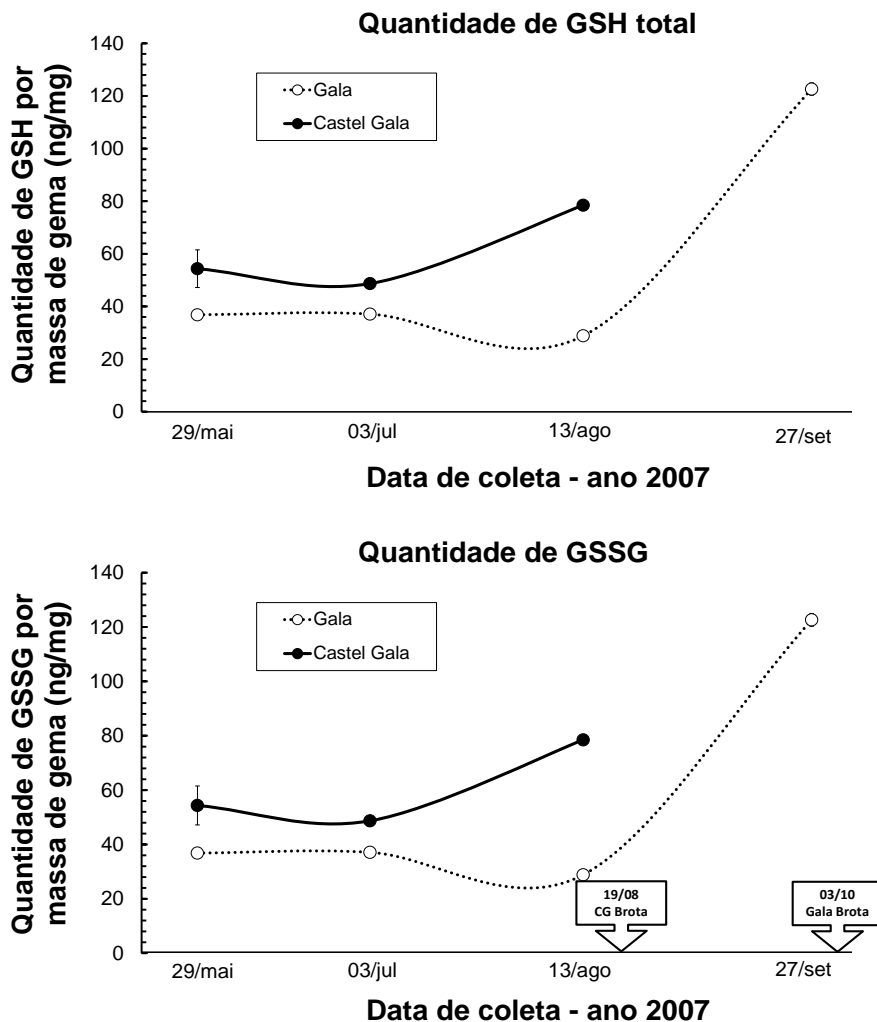


Figura 9. Evolução, durante a dormência, da quantidade de glutatona total e oxidada em relação à massa fresca de gemas de macieiras das cultivares Gala e Castel Gala (CG) amostradas em 2007. Setas indicam as respectivas datas de brotação.

No comparativo de evolução de glutatona total e oxidada (Figura 9), destaca-se que a variação total é inteiramente dependente da quantidade de glutatona oxidada (GSSG). Isto indica que o acúmulo de frio está diretamente associado ao incremento do metabolismo oxidativo nas gemas. Além disso, com esse parâmetro foi possível caracterizar o contraste fisiológico entre as cultivares em relação à exigência de frio hiberna para superar a endodormência. Portanto, as variações dos níveis de glutatona nas gemas dormentes podem auxiliar na melhor definição dos pontos de controle na regulação metabólica da endodormência.

3.3. Bibliotecas de cDNA representando genes diferencialmente expressos, influenciados pelo frio hiberna durante o estabelecimento e a finalização da endodormência.

A estratégia principal desta etapa do trabalho consistiu em gerar bibliotecas representando genes presentes ou mais expressos no início e no final do período de endodormência da cultivar Castel Gala, de menor exigência de frio, em relação à cultivar Gala. RNA Poly (A) obtido das amostras de gemas de ambas as cultivares no início e ao final do processo de dormência foi a matéria-prima inicial para a obtenção das bibliotecas supressivas subtrativas de cDNA conforme descrito por Diatchenko et al. (1996). Utilizou-se o protocolo do PCR-Select™ cDNASubtraction Kit (Clontech) e foram obtidas duas bibliotecas para cada período de amostragem, totalizando quatro bibliotecas, conforme representado na Figura 10. Dessa forma, foram geradas quatro bibliotecas que possivelmente representam os genes predominantemente expressos em Gala subtraídos dos genes expressos em Castel Gala na entrada (G1-K1) e na superação (G2-K2) da dormência, bem como os genes predominantemente expressos em Castel Gala subtraídos dos genes expressos em Gala na entrada (K1-G1) e na superação (K2-G2) da dormência. Ao todo foram obtidos 4241 transformantes. Foram, então, escolhidos aleatoriamente 384 transformantes de cada biblioteca para armazenamento a -80°C até a etapa de sequenciamento. Em virtude do ajuste orçamentário proposto pela financiadora (FINEP) a etapa do sequenciamento não foi contemplada neste projeto, porém está prevista para o projeto REDEMAÇÃ. A Figura 11 representa as diferentes etapas para obtenção das bibliotecas supressivas subtrativas.

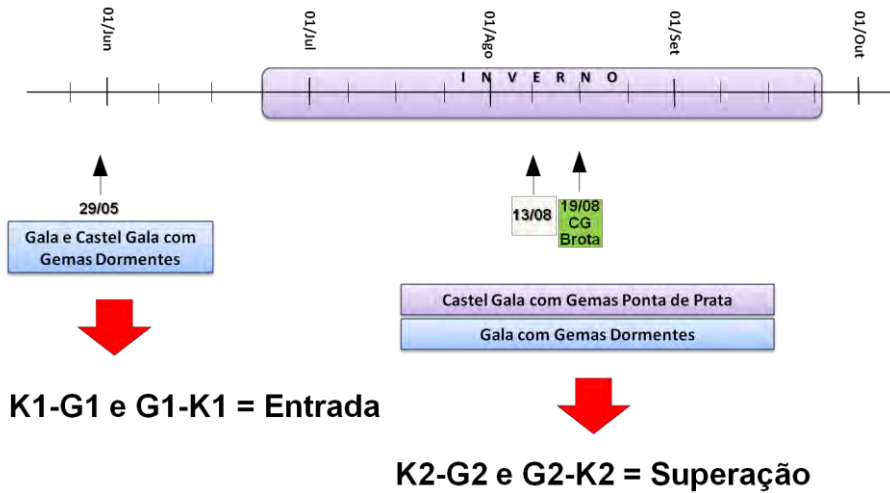


Figura 10. Representação esquemática dos momentos seleccionados para construção das bibliotecas subtraídas durante o inverno de 2007. Datas de amostragem de gemas estão indicadas por setas. CG indica Castel Gala. Os quadros indicam os estádios fenológicos.

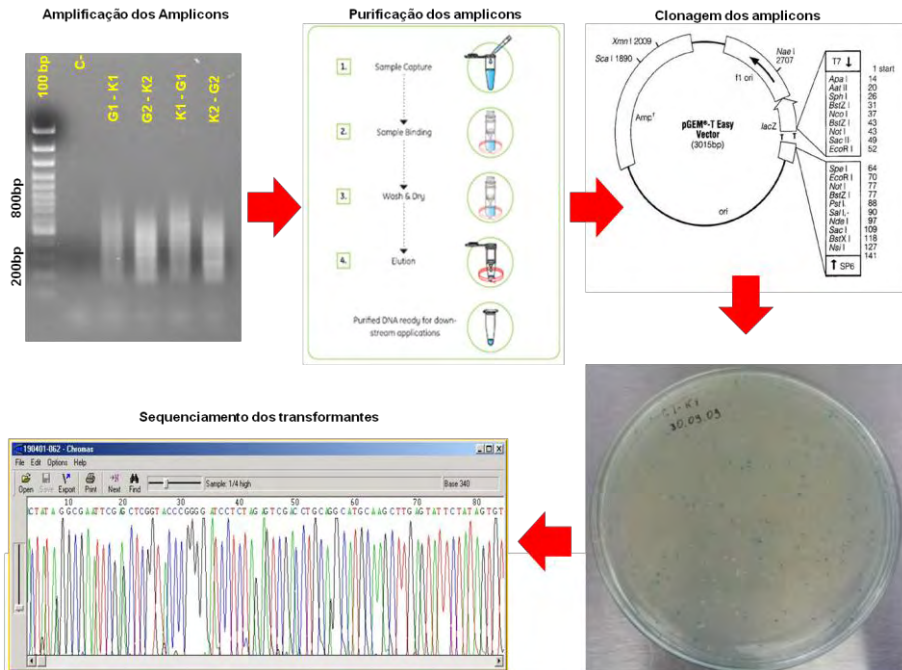


Figura 11. Representação das etapas de obtenção das bibliotecas supressivas subtraídas. C- indica o controle sem cDNA para amplificação. G1-K1, G2-K2, K1-G1 e K2-G2 representam as diferentes bibliotecas obtidas.

4. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES FINAIS

- ✓ O protocolo de avaliação e quantificação de glutatona foi padronizado para gemas de macieira.
- ✓ Os teores de glutatona total aumentam no final do ciclo de dormência, em conjunto com uma crescente oxidação desta molécula, atingindo o ápice de quantidade e oxidação às vésperas da etapa de superação da dormência/brotação.
- ✓ Gala e sua mutante Castel Gala diferem em quantidade e época de acúmulo de glutatona em gemas dormentes, sendo mais os teores mais baixos e mais antecipado em Castel Gala;
- ✓ Os resultados do perfil de glutatona oxidada/reduzida permitem caracterizar o estado fisiológico de dormência em que a gema se encontra.
- ✓ Quatro bibliotecas supressivas subtrativas foram obtidas durante a entrada e a superação do processo de endodormência para as cultivares Gala e Castel Gala.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALANDIER, P. **Étude dynamique de la croissance et du développement des bourgeons de quelques cultivars de pêcher cultivés à diverses altitudes sous le climat tropical de l'île de la Réunion.** 1992. 82 p. Thèse (Doctorat Physiologie Végétale) – Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand.
- BERNARDES, L. M.; GODOY, H. **A Cultura da Macieira no Paraná.** Londrina: IAPAR, 1988. p. 11-18 (IAPAR. Circular, 50)
- CRABBÉ, J.; BARNOLA, P. A. New conceptual approach to bud dormancy in woody plants. In: LANG, G. A. (Ed.). **Plant dormancy: physiology, biochemistry and molecular biology.** New York: CAB International, 1996. p. 83-113.
- DENARDI, F.; SECCON, J. J. Castel Gala: mutação de macieira 'Gala' com baixa necessidade de frio. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 18, p. 78-82, 2005.
- DIATCHENKO, L.; LAU, Y-F.C.; CAMPBELL, A. P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E. D.; SIEBERT, A. P. D. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 6025-6030, 1996.
- FAUST, M.; EREZ, A.; ROWLAND, L. J.; WANG, S. Y.; NORMAN, H. A. Bud dormancy in perennial fruit trees: physiology basis for dormancy induction, maintenance, and release. **Hortscience**, Alexandria, v. 32, p. 623-629, 1997.
- HERTER, F. G. **Dormance des bourgeons et phénologie de quelques cultivars de pommier: effet de la température et interaction avec le génotype.** 1992. 82 p. Thèse (Doctorat Physiologie Végétale) – Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand.
- HULME, M.; SHEARD, N. **Cenários de alterações climáticas para o Brasil.** Norwich: Climatic Research Unit, 1999. 6 p.

- KRANNER, I. Determination of glutathione, glutathione disulphide and two related enzymes, glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in Fungal and plant cells. In: VARMA, A. (Ed.). **Mychorrhiza manual**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1998. p. 227-241.
- KRANNER, I.; GRILL, D. Significance of thiol-disulfide exchange in resting stages of plant development. **Botanica Acta**, Stuttgart, v. 109, p. 8-14, 1996.
- LIMA, M. A.; CABRAL, O. M. R.; MIGUEZ, J. D. G. (Org.). **Mudanças climáticas globais e a agropecuária brasileira**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. 397 p.
- MAUREL, K.; LEITE, G. B.; BONHOMME, M.; GUILLIOT, A.; RAGEAU, R.; PÉTEL, G.; SARK, S. Trophic control of bud break in peach (*Prunus persica*) trees: a possible role of hexoses. **Tree Physiology**, Victoria, v. 24, p. 579-588, 2004.
- PACEY-MILLER, T.; SCOTT, K.; ABLETT, E.; TIGEY, S. CHING, A.; HENRY, R. Genes associated with the end of dormancy in grapes. **Functional & Integrative Genomics**, Berlin, v. 3, p. 144-152, 2003.
- PETRI, J. L.; PALLADINI, L. A.; POLA, A. C. Dormência e indução da brotação da macieira. In: A CULTURA da macieira. Florianópolis: Epagri, 2002. 743 p.
- PRASAD, T. A. Mechanism of chilling induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids and proteases activities. **Plant Journal**, Oxford, v. 10, p. 1017-1026, 1996.
- STAFSTROM, J. P. Regulation of growth and dormancy in pea axillary buds. In: VIÉMONT, J.-D.; CRABBÉ, J. (Ed.). **Dormancy in plants: from whole plant behaviour to cellular control**. Cambridge: University Press, 2000. p. 331-346.
- ZENG, Y.; YANG, T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molecular Biology Report**, Athens, v. 20, p. 417a-417e, 2002.

6. PUBLICAÇÕES GERADAS PELA ATIVIDADE

- ANZANELLO, R.; FIALHO, F. B.; SANTOS, H. P. dos; PERINI, P.; GASPERIN, C. A.; REVERS, L. F.; MARODIN, G. A. B.; BERGAMASCHI, H. Precocidade e uniformidade de brotação de gemas de macieira submetidas a diferentes regimes de temperatura durante o período de dormência. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8.; ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO, 4., 2010, Bento Gonçalves. **Resumos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. p. 13. Resumo.
- ANZANELLO, R.; PERINI, P.; FIALHO, F. B.; SANTOS, H. P. dos; REVERS, L. F.; MARODIN, G. A. B.; BERGAMASCHI, H. Temperatura e tempo de frio para indução e superação de dormência em gemas de macieira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 21., 2010, Natal. **Frutas: saúde, inovação e responsabilidade: anais**. Natal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2010. 4 p. Resumo expandido.
- ANZANELLO, R.; SANTOS, H. P. dos; FIALHO, F. B.; REVERS, L. F.; PERINI, P.; GASPERIN, A. C.; BERGAMASCHI, H.; MARODIN, G. A. B. Caracterização da evolução da dormência e requerimento de frio hibernal em gemas de macieira submetidas a diferentes ciclos diários de temperatura. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 23, p. 186-187, set. 2011. Suplemento. Resumos do XIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal e XIV Reunião Latino-Americana de Fisiologia Vegetal, 19 a 22 de setembro de 2011, Búzios, RJ.
- FALAVIGNA, V. S.; PERINI, P.; REVERS, L. F. Identificação de genes MADS-box associados à dormência no genoma da macieira. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8.; ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO, 4., 2010, Bento Gonçalves. **Resumos...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. p. 33. Resumo.

FALAVIGNA, V. S.; PERINI, P.; REVERS, L. F. Identification of dormancy-associated MADS-box genes in apple. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GENÉTICA MOLECULAR DE PLANTAS, 3., 2011, Ilhéus. **Anais...** [S.l.]: SBG, 2011. p. 68. 1 CD-ROM. Resumo.

FALAVIGNA, V. S.; PORTO, D.D.; BUFFON, V.; PASQUALI, G.; OLIVEIRA, P.R.D.; SANTOS, H. P. dos; REVERS, L. F. Hibridização supressiva substrativa aplicada à identificação de genes associados à dormência de gemas em macieira. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8.; ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO, 4., 2010, Bento Gonçalves. **Resumos...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. p. 32. Resumo.

GASPERIN, A. C.; ANZANELLO, R.; PERINI, P.; REVERS, L. F.; FIALHO, F. B.; SANTOS, H. P. dos. Influência das gemas laterais sobre a gema apical em ramos de macieira da cv. Castel Gala. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8.; ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO, 4., 2010, Bento Gonçalves. **Resumos...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. p. 41. Resumo.

PERINI, P.; BEKER, S.; ZANATTA, F.; REVERS, L. F.; SANTOS, H. P. dos. Caracterização do nível de oxidação de glutationa durante a dormência hiberna em gemas de macieira. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA UVA E VINHO, 6.; ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO, 2., 2008, Bento Gonçalves. **Resumos...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. p. 41. Resumo.

PERINI, P.; PASQUALI, G.; MÁRGIS-PINHEIRO, M.; OLIVEIRA, P. R. D.; REVERS, L. F. Reference gene selection for gene expression studies in apple. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GENÉTICA MOLECULAR DE PLANTAS, 3., 2011, Ilhéus. **Anais...** [S.l.]: SBG, 2011. p. 60. 1 CD-ROM. Resumo.

PERINI, P.; PASQUALI, G.; MARGIS-PINHEIRO, M.; REVERS, L. F. Seleção de genes-referência para estudos de expressão gênica utilizando PCR quantitativa em macieiras. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8.; ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO, 4., 2010, Bento Gonçalves. **Resumos...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. p. 31. Resumos.

PERINI, P.; PASQUALI, G.; MARGIS-PINHEIRO, M. A. N.; REVERS, L. F. Caracterização do perfil transcricional em gemas de cultivares de macieira contrastantes para a exigência de frio durante a dormência hiberna. In: REUNIÃO ANUAL DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR DO CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DA UFRGS, 12., 2010, Porto Alegre. **Livro de resumos.** Porto Alegre: UFRGS, 2010. p. 96. Resumo.

PORTO, D. D.; FALAVIGNA, V. S.; BUFFON, V.; PASQUALI, G.; OLIVEIRA, P. R. D.; SANTOS, H. P. dos; REVERS, L. F. Differential gene expression of two apple cultivars with contrasting chilling requirement. In: INTERNATIONAL ROSACEAE GENOMICS CONFERENCE, 5., 2010, Stellenbosch. **Programme & abstract book.** [S.l.: s.n., 2010]. Não paginado. Resumo P34.

PORTO, D. D.; FALAVIGNA, V. S.; BUFFON, V.; PASQUALI, G.; OLIVEIRA, P. R. D.; SANTOS, H. P. dos; REVERS, L. F. Differential gene expression of two apple cultivars with contrasting chilling requirement. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GENÉTICA MOLECULAR DE PLANTAS, 3., 2011, Ilhéus. **Anais...** [S.l.]: SBG, 2011. p. 63. Resumo.

