UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Influência da aplicação de ácido indol-3-acético na expressão dos receptores de etileno e na atividade de duas enzimas relacionadas ao metabolismo de amido em bananas

Mariana Faulin Foresto

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Eduardo Purgatto

São Paulo
2012

Influência da aplicação de ácido indol-3-acético na expressão dos receptores de etileno e na atividade de duas enzimas relacionadas ao metabolismo de amido em bananas

Mariana Faulin Foresto

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo para obtenção do grau de
MESTRE

Área de Concentração: Bromatologia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Purgatto

Versão corrigida

São Paulo

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

	Foresto, Mariana Faulin
F718i	Influência da aplicação de ácido indol-3-acético na expressão dos receptores de etileno e na atividade de duas enzimas relacionadas ao metabolismo de amido em bananas / Mariana Faulin Foresto. -- São Paulo, 2012. 62p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Purgatto, Eduardo 1. Banana : Bioquímica dos alimentos 2. Frutas : Pós-colheita : Agricultura 3. Carboidratos : Ciências dos Alimentos 4. Hormônio : Bioquímica vegetal I. T. II. Purgatto, Eduardo, orientador.
	641.3477 CDD

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Mariana Faulin Foresto

Influência da aplicação de ácido indol-3-acético na expressão dos receptores de etileno e na atividade de duas enzimas relacionadas ao metabolismo de amido em bananas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof Dr Eduardo Purgatto
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Aos meus pais, Sonia e José Elias, por valorizarem a educação.
À minha irmã, Juliana, que promoveu o início de toda essa história.
À Bruno.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Bruno, por toda paciência e apoio em todos os momentos;

Ao meu orientador, Eduardo Purgatto, que acreditou em minha capacidade, me deu coragem, foi amigo;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade cedida à realização deste mestrado;

À Helena Chiebao, Bruna Lima e Laís Moro, pela parceria, amizade;

À Claudinéia Soares, pela solicitude com os experimentos de atividade enzimática;

À Sabrina Broetto, por toda ajuda com os experimentos de biomol;

À Florence Castelan, pela generosidade em ceder frutos para amostragem e me acompanhar até os bananais do Vale do Ribeira;

À Márcia, Tânia Shiga, Lúcia, Aline Santos, pelo apoio técnico e amizade;

Aos professores Thomas Ong e Fernando Moreno por cederem as lâminas de aço inoxidável;

Ao laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Laboratório da Professora Dr^a Silvia M. Franciscato Cozzolino, por compartilhar o uso do espectrofotômetro para ácidos nucleicos;

À Bruna Lima, Regina Stanquevis, Renata Figueiredo, Renata Shitakubo, Talita Pimenta, Geovana Sagrado, Juliana Nunes, Fernanda Peroni, Helena Chiebao, Ana Sansone, Laís Moro, Claudinéia Soares, Sabrina Broetto, Gabriela Schmitz, Florence Castelan, Lorenzo Saraiva, Márcia, Tânia Shiga, Lucia, Aline de Oliveira Santos, João Paulo Fabi, Vitor, Neusa Hassimotto, pela amizade;

Aos professores Beatriz Rosana Cordenunsi, João Roberto Oliveira do Nascimento, Luciano Freschi e Claudinéia Soares pelas sugestões dadas ao trabalho;

À Fernanda Lacellotti, Camila Negrão, Aline Cobello, pelo apoio, amizade e por me ajudarem neste percurso;

À todos os outros amigos que, de alguma forma, estiveram me apoiando neste período;

À todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas;

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) pelo concedimento da bolsa e pelo apoio financeiro necessário ao desenvolvimento deste trabalho.

"O mundo está cheio de coisas mágicas que pacientemente esperam que a nossa percepção fique mais aguçada."

(Bertrand Russell)

RESUMO

FORESTO, M.F. **Influência da aplicação de ácido indol-3-acético na expressão dos receptores de etileno e na atividade de duas enzimas relacionadas ao metabolismo de amido em bananas.** 2012, 62p. Dissertação de mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos – Área de Bromatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

A literatura têm indicado que a via metabólica de degradação de amido em bananas é regulada tanto por etileno quanto por auxinas, dentre outros fatores. Visando melhor entender o mecanismo pelo qual isso ocorre, acompanhou-se o amadurecimento de bananas infiltradas com ácido indol-3-acético (AIA) utilizando um modelo de infiltração do hormônio em fatias do fruto. Foram avaliados os níveis de AIA endógeno, a evolução na degradação de amido e síntese de açúcares solúveis, a ocorrência de alterações na transcrição e atividade das enzimas β -amilase e DPE2 e a possível correlação destes eventos com alterações na via de transdução de sinal de etileno - hormônio reconhecidamente responsável por desencadear a ativação do metabolismo degradatório de amido durante o amadurecimento. Nos frutos tratados com AIA, os resultados apontaram atraso na degradação de amido e no acúmulo de açúcares solúveis; as variações nos níveis de atividade e de transcritos de β -amilase nos grupos controle e tratado foram semelhantes; contudo, no grupo tratado a evolução destes processos ocorreu com atraso em relação ao controle. Os níveis de transcritos de DPE2, mais expressivos no início do amadurecimento em ambos os grupos, foram sustentados por mais tempo nos frutos tratados; a atividade, no entanto, parece ter sido sensivelmente inibida pelo tratamento com AIA. Os perfis de transcritos dos receptores de etileno ERS3 e ETR1 apontam que os mesmos foram fortemente afetados pelo tratamento. Assim, os resultados sugerem que modificações no padrão de sinalização do etileno podem ser parte do mecanismo pelo qual AIA afeta o perfil de transcritos e atividade de β -amilase e DPE2, provocando, em consequência, atraso no processo de mobilização da reserva de amido na banana e também na síntese de açúcares.

Palavras-chave: amido, ácido indol-3-acético, β -amilase, DPE2, receptores de etileno.

ABSTRACT

FORESTO, M.F. **Influence of the indole-3-acetic acid levels on expression of ethylene receptors and on activity of starch -metabolizing enzymes in bananas.** 2012, 62 p. Dissertação de mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos – Área de Bromatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

The literature indicates that the starch degradation in bananas is probably regulated by ethylene and auxins, among other factors. To understand the mechanisms involved, we followed the ripening of banana slices infiltrated with indole-3-acetic acid (AIA). We measured the evolution of endogenous AIA levels and starch degradation, as well as shifts in transcription and activity of β -amilase and DPE2 and their possible correlation with alterations in the ethylene signal transduction path. In AIA-treated slices, results indicated delay in starch degradation and accumulation of soluble sugars; the changes in β -amilase transcripts and activity levels in control and treated groups were similar, although they were delayed for the AIA-treated group, when compared to control. DPE2 transcript levels, stronger in the earlier stages of ripening in both groups, were sustained longer in AIA-treated bananas; on the other hand, its activity seems to have been severely inhibited by the AIA treatment. The transcript profiles of ERS3 and ETR1 ethylene receptors indicate that they were both strongly affected by the treatment. In this way, the results suggest that modifications in the ethylene signaling pathway may be part of the mechanism by which high level of AIA affects the profile of transcripts and activities of β -amilase and DPE2, inducing the delay in the mobilization of the starch reserve of the bananas, as well as the sugar synthesis.

Keywords: starch, AIA, β -amilase, DPE2, ethylene receptors.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 AMADURECIMENTO	13
1.2 METABOLISMO DE AMIDO	14
1.3 ETILENO: BIOSÍNTESE E SINALIZAÇÃO	16
1.4 RESPOSTAS FENOTÍPICAS RELACIONADAS ÀS DIFERENTES CLASSES DE RECEPTORES	20
1.5 AUXINAS: BIOSÍNTESE E SINALIZAÇÃO	22
1.6 REGULAÇÃO POR ETILENO E AUXINA DO METABOLISMO AMIDO-SACAROSE	26
2 OBJETIVO	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 FRUTOS E INFILTRAÇÃO EM FATIAS DE BANANA	31
3.2 RESPIRAÇÃO E PRODUÇÃO DE ETILENO	32
3.3 AMIDO E AÇÚCARES SOLÚVEIS	32
3.4 DETERMINAÇÃO DE AIA LIVRE	33
3.5 PREPARAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO	34
3.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	34
3.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	34
3.7.1 Atividade enzimática de β -amilase	34
3.7.2. Atividade enzimática de DPE2	35
3.8 ANÁLISE DE NÍVEL DE TRANSCRITOS POR QRT-PCR	35
3.8.1 Extração de RNA, purificação, síntese de cDNA	35
3.8.2 <i>Primers</i> utilizados na amplificação dos genes codificadores dos receptores de etileno de bananas	36
3.8.3 Desenho dos <i>primers</i> para os genes codificadores de β -amilase e DPE2	36
3.9 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 AMOSTRAGEM COM INFILTRAÇÃO DE ACC ASSOCIADO À AIA EM FATIAS DE BANANA cv NANICÃO	49
5 CONCLUSÕES	52
6 REFERÊNCIAS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de degradação de amido em folhas de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Adaptado de Smith <i>et al.</i> (2005).	15
Figura 2: Modelo de biossíntese de etileno proposta por Yang e Hoffamn (1984). Adaptado de Pech <i>et al.</i> (2003).	17
Figura 3: Modelo da via de transdução de sinal do etileno em tomates (Adaptado de CARA E GIOVANNONI, 2008).	18
Figura 4: Modelo de biossíntese de auxinas. Adaptado de Tromas e Perrot- Rechenmann (2010).	23
Figura 5: Mecanismo hipotético vigente de percepção da auxina. Adaptado de Weijers e Jüergens (2004).	24
Figura 6: Interação entre AUX/IAA e ARF através dos domínios III e IV da estrutura de AUX/IAA, que contém a região TGTCTC, denominada ARE com a região dos domínios III e IV dos ARF, inativando-os e impedindo a transcrição de genes de resposta à auxina. Adaptado de Quint e Gray (2006).	25
Figura 7: Modelo simplificado da interação entre TIR1 e AUX/IAA.	26
Figura 8: Efeitos do tratamento com AIA sobre a produção de etileno (I), respiração (II) e amido (III), em bananas cv. Nanicao pós-colheita controle e tratadas com AIA 100 µM.	39
Figura 9: Representação das curvas de dissociação referente ao <i>primer</i> MaBAM. As imagens foram obtidas do software Rotor Gene 6.0.	40
Figura 10: Atividade enzimática (acima) e níveis de transcritos (abaixo) de β-amilase dos grupos controle e tratado com AIA 100µM.	41
Figura 11: Representação das curvas de dissociação referente ao <i>primer</i> MaDPE2. As imagens foram obtidas do software Rotor Gene 6.0.	42
Figura 12: Atividade enzimática (acima) e níveis de transcritos de DPE2 (abaixo) dos grupos controle e tratado com AIA 100µM.	43
Figura 13: Efeitos do tratamento com AIA sobre a síntese de maltose (I), glicose(II) sacarose(III) e frutose (IV), em bananas cv. Nanicao pós-colheita controle e tratadas com AIA 100 µM.	43
Figura 14: Efeitos do tratamento com ácido indol-3-acético sobre os níveis de AIA livre na polpa de bananas cv Nanicao controle e tratadas com AIA 100 µM (acima) e sobre a degradação de amido (abaixo) nos mesmos frutos.	45
Figura 15: Efeitos do tratamento com AIA 100µM sobre a transcrição de genes dos receptores de etileno (I) MaERS1, (II) MaERS2, (III) MaERS3, (IV) MaETR1 de bananas cv Nanicao controle e tratadas.	45
Figura 16: Tomates da cultivar VNFT Cherry controle e tratados com ácido indol-3-acético (AIA) 100uM durante o amadurecimento. C.	47
Figura 17: Efeitos da infiltração de AIA 100uM e PCIB 100uM sobre a degradação de amido e síntese de glicose frutose e sacarose em fatias de banana cv Nanicao.	49
Figura 18: Efeito da aplicação combinada de ACC 100uM e AIA 100uM em tomates.	50
Figura 19: Perfil de produção de etileno e de degradação de amido dos frutos controle, tratados com solução contendo ACC 100µM e tratados com solução contendo ACC 100µM e AIA 100µM.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela1: Sequência de nucleotídeos e tamanho esperado para o produto de amplificação dos genes que codificam os receptores de etileno ERS1, ERS2, ERS3, ETR1 e do gene da Actina de *Banana*, cv Nanicão (CHIEBAO, 2011).....36

Tabela 2: Sequência de nucleotídeos, região amplificada e tamanho esperado para o produto de amplificação dos genes que codificam as enzimas β -amilase (MaBAM) e DPE2 (MaDPE2) de *Banana*, cv Nanicão.....37

Tabela 3: Resultados da eficiência e concentrações de cDNA e *primers* utilizadas nas reações de PCR em tempo real referente a enzima β -amilase de *Musa accuminata*, cv Nanicão.....40

Tabela 4: Resultados da eficiência e concentrações de cDNA e *primers* utilizadas nas reações de PCR em tempo real referente a enzima DPE2 de *Musa accuminata*, cv Nanicão.....42

1 INTRODUÇÃO

1.1 AMADURECIMENTO

Amadurecimento é uma etapa do desenvolvimento de frutos que marca a maturidade fisiológica da semente apta a ser dispersa e germinar. Durante o período a que se denomina amadurecimento, uma série de mudanças bioquímicas, fisiológicas e morfológicas culminam na alteração de aroma, cor, textura e sabor dos frutos, facilitando a dispersão das sementes por meios bióticos e/ou abióticos (GIOVANNONI, 2004).

O conhecimento aprofundado que hoje temos a respeito de amadurecimento teve sua base construída a partir do fim do século XIX, época de que datam os primeiros trabalhos avaliando mudanças fisiológicas críticas que mais tarde foram agrupadas no termo “amadurecimento”. Junto às discussões, evidências associando um novo fator promotor de amadurecimento de ervilhas, o gás etileno, foram apresentadas por Neljubow (NELJUBOW, 1901). Posteriormente, a observação de que inúmeros fatores poderiam influenciar e modular o amadurecimento possibilitaram, em longo prazo, compreendê-lo como um processo bastante ordenado, finamente regulado e que incluía mudanças metabólicas além da desorganização tecidual, antes considerada como definição do amadurecimento.

Mais recentemente, o papel das auxinas foi evidenciado pela constatação de que morangos sem os aquênios amadureciam mais rapidamente (NITSCH, 1955) possibilitando identificar outro fator associado a este processo. No fim do século XX e início do XXI a concepção sobre amadurecimento ganhou novo aprofundamento com os avanços da biologia molecular e, somado aos conhecimentos anteriores, passou-se a considerá-lo o resultado de toda uma programação genética que ocorre mesmo durante etapas anteriores de formação do fruto.

Do ponto de vista biológico, o conjunto destas transformações é importante por inúmeras razões, dentre elas para a propagação de sementes na natureza, para a nutrição dos animais e, sob o ponto de vista horticultural, para obtenção de frutos com características desejáveis pelos consumidores.

Em bananas, o amadurecimento é responsável pelas alterações na coloração da epiderme, cuja clorofila é degradada e dá lugar aos carotenóides de cor amarela (NOGUEIRA *et al.*, 2007); no aroma que torna-se marcante, principalmente devido à formação de ésteres, sobretudo de acetato de isoamila, responsável pelo aroma característico destes frutos (BOUDHRIOUA *et al.*, 2003); na textura de polpa, resultado da ação de enzimas pécnicas e da

degradação do amido e posterior formação de açúcares (ASIF e NATH, 2005; MOTA *et al.*, 1997), também responsáveis pelo sabor dos frutos.

1.2 METABOLISMO DE AMIDO

O amido, principal reserva energética de plantas, é um polissacarídeo, cuja degradação, em frutos, é determinada por uma rede complexa de enzimas. A ativação expressiva desta via metabólica ocorre durante o amadurecimento e o resultado final, a síntese de açúcares solúveis, influencia diretamente aspectos de qualidade, como o sabor e a textura.

O grânulo do amido é acumulado no amiloplasto e possui uma estrutura complexa, com formatos e tamanhos variados, dependendo da espécie, cultivar e estágio do desenvolvimento do órgão vegetal (MOTA *et al.*, 1997). De uma maneira geral, sua estrutura é formada por 2 polímeros de glicose, denominados amilose e amilopectina, a primeira composta por uma cadeia linear de glicoses unidas por ligações α -1,4 e poucas ramificações e a segunda por um número expressivo de ramificações formadas por ligações α -1,6 entre carbonos (TETLOW *et al.*, 2004).

Nos frutos ainda em desenvolvimento, o amido é sintetizado a partir da enzima ADPglicose pirofosforilase (ADPGPPase; EC 2.7.7.23), que catalisa a conversão de Glicose 1-P em ADPglicose, com a participação de ATP e liberação de uma molécula de pirofosfato. A ADP-glicose é, então, utilizada como substrato pela Amido Sintase (AS; EC 2.4.1.21), que adiciona unidades de glicose ao final de uma cadeia de glicanos pré-existente, formando dessa maneira, o polímero de amido e liberando uma molécula de ADP. As ramificações características da amilopectina são introduzidas pela Enzima Ramificadora de Amido (SBE; EC 2.4.1.28), que hidroliza ligações α -1,4 e cria no lugar, ligações α -1,6 com outra unidade de glicose (MARTIN E SMITH, 1995).

Durante o climatério, os frutos que acumulam amido passam a mobilizá-lo através de enzimas hidrolíticas e fosforolíticas, em sua maioria. Em banana cv. Nanicão, por exemplo, isso pode representar a redução de 12 a 20% do peso em amido dos frutos verdes a menos de 1% nos frutos maduros (CORDENUNSI E LAJOLO, 1995). Neste mesmo período, o conteúdo de sacarose proveniente da degradação de amido, pode atingir níveis ao redor de 12% (ARÊAS E LAJOLO, 1980).

Embora ainda não haja um modelo de degradação do amido proposto para frutos, muitos dos elementos encontrados em folhas já tiveram sua expressão gênica e/ou atividade detectada em bananas (PURGATTO *et al.*, 2001, MAINARDI *et al.*, 2006), mangas

(BERNARDES-SILVA *et al.*, 2008) e maçãs (REIDL *et al.*, 2008, WANG E ZHANG, 2002), o que permite utilizá-lo como base aos estudos com frutos. A figura 1 representa o modelo mais aceito atualmente como via de degradação do amido em folhas.

Figura 1: Modelo de degradação de amido em folhas de *Arabidopsis thaliana*. Adaptado de Smith *et al.* (2005).

Várias das proteínas descritas na Figura 1 já foram identificadas em frutos de bananeira, como as fosforilases (ARÊAS E LAJOLO, 1981), α -1,6-glicosidase e α -amilase (GARCIA E LAJOLO, 1988) e a β -amilase (KAPLAN *et al.*, 2006). Também sequências de DNA homólogas a DPE1, a DPE2, a GWD e ao transportador de Maltose (MEX1) também foram identificadas neste fruto, a partir dos respectivos mRNAs (dados não publicados).

As informações acerca da regulação da expressão dos genes e atividade das respectivas proteínas que compõem esta via ainda estão em fase de estudos e a presente proposta vem se juntar a este esforço.

Deste quadro metabólico, são destacadas neste trabalho, as enzimas β -amilase (EC 3.2.1.2) e a 4- α -glicanotransferase 2, também denominada *DISPROPORTIONATING ENZYME 2* (DPE2) (EC:2.4.1.25).

A β -amilase ou 1,4- α -D-maltohidrolase é uma exoamilase, que pode estar localizada no cloroplasto (LAO *et al.*, 1999), no vacúolo (ZIEGLER e BECK, 1986) ou no citoplasma (VAN DAMME *et al.*, 2001). Em *Arabidopsis thaliana* nove isoformas foram identificadas (LAO *et al.*, 1999) e em bananas, quatro (GARCIA E LAJOLO, 1988).

Elas atuam na hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 de oligossacarídeos, a partir de suas extremidades não redutoras, provenientes da degradação inicial do grânulo de amido,

removendo por consequência, unidades de maltose. Esta é então, transportada ao citosol, através de transportadores de maltose denominados MEX1, onde será utilizada como substrato à DPE2 (SMITH *et al.*, 2005).

A maltose é formada pela união de duas moléculas de glicose e possui importância fundamental à planta, uma vez que é açúcar precursor da síntese de sacarose e demais hexoses. Além disso, Kaplan e Guy (2004), observaram, *in vitro*, que este carboidrato possui a capacidade de proteger proteínas, membranas e a cadeia de transporte de elétrons, em situações de stress por calor e congelamento.

A enzima DPE2, localizada no citosol catalisa a transferência de um grupo glicosil proveniente da molécula de maltose resultante da ação de β -amilase, para uma nova posição em outro glicosídeo aceptor, o qual pode ser um heteroglicano, composto por arabinose, glicose e galactose (YANG E STEUP, 1990). O segundo resíduo glicosil é liberado como glicose (FETTKE *et al.*, 2009; LLOYD *et al.*, 2005) e segue para via das hexoses.

Mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes em MEX1 ou DPE2 mostraram acúmulo de amido no plastídio e crescimento comprometido. Nos mutantes MEX1 foi observado acúmulo de maltose no cloroplasto e nos mutantes DPE2 puderam ser vistos altos níveis de maltose no citosol e nos plastídios (LU e SHARKEY, 2004). A similaridade dos fenótipos de tais mutantes indicam a função fundamental destas proteínas no metabolismo de amido e sugerem que a maltose exportada ao citosol e metabolizada por DPE2 constitui um fluxo que não parece ser funcionalmente substituído por outras rotas (FETTKE *et al.*, 2010).

Mutantes de *Arabidopsis thaliana* defectivos em β -amilase (FULTON *et al.*, 2008) e DPE2 (CHIA *et al.*, 2004, LU e SHARKEY, 2004) mostraram severo acúmulo de amido em folhas, permitindo considerar tais enzimas como fundamentais ao metabolismo de amido transitório. Embora existam evidências que apontem uma participação similar destas enzimas na mobilização da reserva de amido em bananas, mais informações são necessárias para se verificar a relevância destas em frutos.

1.3 ETILENO: BIOSÍNTESE E SINALIZAÇÃO

O etileno é um hormônio vegetal que participa de inúmeros processos do desenvolvimento vegetal, como germinação de sementes, expansão celular, diferenciação celular, florescimento, senescência, abscisão. É fato, no entanto, que a relação etileno e amadurecimento, concebida a mais de um século, possibilitou a este hormônio a denominação de “hormônio do amadurecimento”, uma vez que as evidências indicaram sua estreita relação

com a regulação da expressão de genes e de proteínas das mais diversas vias metabólicas desta etapa – o que inclui a via de degradação de amido.

A via biossintética do etileno, proposta por Adams e Yang (1979), baseia-se na conversão da L-metionina a etileno, incluindo como intermediários a S-ADENOSILMETIONINA (SAM), ÁCIDO 1-AMINOCICLOPROPANO 1-CARBOXÍLICO (ACC), 5-METILTIOADENOSINA (MTA) e 5-METILTIORIBOSE, além das enzimas ACC sintase, ACC oxidase. A figura 2, mostra com maiores detalhes os componentes desta via.

Figura 2: Modelo de biossíntese de etileno proposta por Yang e Hoffamn (1984). Adaptado de Pech *et al.* (2003).

A conversão de SAM à ACC e MTA, catalisada pela ACC sintase é o ponto chave desta via metabólica; qualquer alteração, seja na atividade ou expressão de ACC, pode resultar em desbalanço nos níveis do hormônio (YANG E HOFFMAN, 1984).

Tendo em vista a biossíntese de etileno, torna-se importante entender por meio de quais mecanismos este hormônio promove sua ação no vegetal. Sabe-se que mudanças metabólicas desencadeadas pelo etileno são decorrentes de vários passos, que vão desde a síntese, à percepção, seguida da transdução de sinal a genes reguladores, culminado na expressão de genes etileno-dependentes (CARA E GIOVANNONI, 2008).

Os estudos pioneiros que identificaram os principais componentes da via de transdução de sinal basearam-se em mutantes com perda e ganho de função de receptores (SAKAI *et al.*, 1998, HUA *et al.*, 1995, CHANG *et al.*, 1993). Foi observado, que os

mutantes com ganho de função no receptor não exibiam respostas fenotípicas à presença do hormônio, enquanto que as plantas com perda de função no receptor apresentavam resposta constitutiva ao etileno. Desde então, ficou evidenciado o mecanismo de regulação negativo exercido pelos receptores.

Por meio do modelo proposto na figura 3, pode-se observar que os receptores são os primeiros componentes da via de sinalização e apresentam-se em número e com estrutura variável em diferentes espécies de plantas. Em *Arabidopsis thaliana*, são encontradas 5 isoformas (Chen *et al.*, 2005); em tomates 6 (HUA *et al.*, 1998; SAKAI, *et al.*, 1998) e em bananas, 4 a saber ETR1, ERS1, ERS2 e ERS3 (Número de acesso no Genbank: AF113748, AB266315.1, AF445195.1, AF445196.1).

Figura 3: Modelo da via de transdução de sinal do etileno em tomates (Adaptado de CARA E GIOVANNONI, 2008). A ligação do etileno ao receptor faz com que a proteína CTR1 deixe de interagir com este último. A transdução de sinal ocorre via MAP kinases até a proteína EIN2, que transmite o sinal a componentes nucleares, como os EILs e ERFs, que regulam a transcrição de genes de resposta ao etileno. EIN2 - *ETHYLENE INSENSITIVE 2*; EIL - *EIN3-like*; ERF - *ETHYLENE RESPONSE FACTORS*.

Os receptores contém um padrão estrutural bastante similar. Apresentam 2 frações idênticas ligadas por pontes dissulfeto na região N-terminal (SCHALLER *et al.*, 1995), a qual contém um sítio de ligação para o etileno; na região C-terminal localiza-se o domínio receptor (BINDER, 2008). Além disso, apresentam um domínio transmembrana e um domínio sensor de ligação para o íon cobre, o qual permite a efetiva associação do hormônio ao receptor (RODRIGUEZ *et al.*, 1999). Outro domínio contido nesta estrutura - denominado GAF - tem sido relacionado às interações físicas entre receptores (GAO, 2008).

Apesar das similaridades estruturais, os receptores apresentam diferentes atividades de quinase em domínios contidos no C-terminal, o que os permite, em *Arabidopsis thaliana*, serem divididos em “Subfamília I”, formada pelos receptores ERS1 e ETR1, que apresentam domínio com atividade de histidina quinase e “Subfamília II”, composta pelos receptores ETR2, ERS2, EIN4 e NR, os quais possuem um domínio histidina quinase degenerado e atividade de serina-quinase (BINDER, 2008; KENDRICK E CHANG, 2008).

Existe uma grande discussão na literatura a respeito da atividade de quinase do receptor ser imprescindível ou não à sinalização. Aparentemente, ao menos para ETR1 de *Arabidopsis thaliana*, essa atividade não é requerida, mas estaria envolvida na promoção de maior sensibilidade ao hormônio, estabilidade da molécula, controle fino da transmissão do sinal e controle da degradação de receptores (GUO E ECKER, 2004; GAMBLE *et al.*, 2002).

Na ausência de etileno, os receptores interagem com as proteínas CTR1 (proteínas similares às da família Raf de serina/treonina quinases de mamíferos). Segundo Adams *et al.* (2004), em tomates podem ser encontradas diferentes isoformas de CTR (LeCTR1, LeCTR2, LeCTR3 e LeCTR4), diferencialmente expressas no desenvolvimento do fruto, sendo a CTR1 expressa, principalmente, no amadurecimento.

A interação entre receptor e CTR pode ocorrer através de um domínio transmissor e um domínio regulatório de CTR. Na ausência do hormônio, o complexo se mantém estável, o que em *Arabidopsis thaliana* se deve principalmente às interações com os receptores da “Subfamília I”, fato possivelmente correlacionado à presença dos domínios histidina quinase (CANCEL E LARSEN, 2002; WANG *et al.*, 2003).

Ambos os tipos de receptores são sinalizadores negativos da via de transdução de sinal e estão localizados no retículo endoplasmático - RE (MA *et al.*, 2006, CHEN *et al.*, 2002, GAO *et al.*, 2003). O mecanismo de ação negativo na ausência de etileno pode ser explicado pela ativação de CTR quando esta interage com o receptor, a qual reprime as respostas ao hormônio, muito possivelmente pela inativação, via fosforilação, da cascata de MAP quinases subsequente (KIEBER *et al.*, 1993; OUAKED *et al.*, 2003).

Na presença do etileno e sua ligação, ocorre uma mudança conformacional no receptor e CTR1, de modo que ambos se desacoplam (GAO *et al.*, 2008). Dessa maneira, a cascata de MAP quinases (MAPKs) é liberada de sua inatividade, agindo nos próximos componentes da via, as *ETHYLENE INSENSITIVE 2* – EIN2.

A proteína EIN2 aparentemente possui um papel central na sinalização de etileno, de modo que, quando estimulada, transfere o sinal proveniente da cascata de MAPKs para as proteínas nucleares *ETHYLENE INSENSITIVE 3* (EIN3)/ *EIN3-like* (EIL). Zhu *et al.* (2006)

mostraram que esta proteína EIN2 é expressa de modo constante durante todas as fases do desenvolvimento de tomates e que o silenciamento de seu gene promoveu atraso no desenvolvimento e amadurecimento dos frutos além de declínio na expressão de genes responsivos à auxina, indicando ser EIN2 um intermediador de *crosstalk* entre etileno e auxina.

Bisson *et al.* (2009), mostraram que EIN2 pode estar localizada no RE e interage com o receptor ETR1 e CTR1, formando um grande complexo que ativaria as proteínas nucleares EIN3 e as EIL de *Arabidopsis thaliana*.

EIN3 e EIL, localizadas no núcleo, têm sido consideradas as principais responsáveis em estimular a expressão de genes relacionados à senescência, amadurecimento e síntese de proteínas nucleares, como os *ETHYLENE RESPONSE FACTORS* (ERFs) através da ligação com *ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENTS* (ERE) (SOLANO *et al.*, 1998, CHAO *et al.*, 1997) localizados na região promotora dos ERFs.

Na ausência de etileno, são baixos os níveis da proteína EIN3. Os estudos de Guo e Ecker (2003), mostraram que tal proteína sofre regulação pós traducional por meio das proteínas Fbox EBF-1 e EBF-2, que marcam as EIN3 para o sistema de degradação proteassomo 26S na ausência do hormônio.

Com etileno presente, o status de EIN3 é rapidamente alterado. *ETHYLENE INSENSITIVE 5* (EIN5), uma exorribonuclease do citoplasma, é ativada pelo hormônio e antagoniza os efeitos promovidos por EBF1 e 2 por meio do estímulo ao decaimento dos níveis de mRNA destas proteínas, o que resulta em acúmulo de EIN3 e liberação da via de sinalização de etileno (GUO E ECKER, 2003).

Os *ETHYLENE RESPONSE FACTORS* (ERF) e os *ETHYLENE RESPONSES DNA BINDING FACTORS* (EDF), cuja expressão é ativada pelos EIN3 e EILs, são componentes da via de sinalização do etileno que reprimem ou estimulam diretamente no DNA a transcrição do mRNA se ligando às frações GCC-box do promotor de diversos genes, como da fitoeno sintase e da poligalacturonase, ambas em tomates (HAO *et al.*, 1998).

1.4 RESPOSTAS FENOTÍPICAS RELACIONADAS ÀS DIFERENTES CLASSES DE RECEPTORES

Todas as diferenças e semelhanças entre os receptores são parte de um mecanismo que torna possível as distintas respostas frente aos diferentes estímulos recebidos pelas plantas. De acordo com o trabalho de Wang *et al.* (2003), a perda de função de 2 receptores da

“Subfamília I” de *Arabidopsis thaliana* não pode ser compensada pela superexpressão de nenhum receptor da “Subfamília II”, indicando que os receptores de cada subfamília possui um papel único e necessário à sinalização.

Além disso, as associações entre receptores também foram vistas evocando diferentes respostas na mesma planta. De acordo com Gao *et al.* (2008), ETR1 de *Arabidopsis thaliana* se associa preferencialmente aos membros da “Subfamília II”, por meio da proteína GAF. Quando tratadas com etileno, tais interações foram modificadas, bem como a composição de receptores no RE, o que, segundo os autores pode estar associada a alterações metabólicas específicas na célula.

Adicionalmente, sabe-se que algumas proteínas são capazes de regular a atividade do receptor, alterando suas respostas na planta. A proteína *REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY1* (RTE1) de *Arabidopsis thaliana* e a *GREEN RIPE* (GR) de tomates, localizadas no RE, quando superexpressas, causam insensibilidade de ETR1 ao etileno, fato relacionado à alteração na estrutura protéica do receptor. Pode-se dizer que RTE1/GR fazem parte de um sistema de *feedback* negativo da sinalização, dado que sua expressão é induzida pelo etileno (RESNICK *et al.*, 2006).

Conforme apontam estudos em frutos, o programa de amadurecimento requer a expressão diferencial dos genes dos componentes desta cascata de sinalização e para os receptores isto não é diferente. O modelo de transdução de sinal de etileno prediz que a magnitude das respostas e a sensibilidade ao hormônio aumentam quando o número de receptores decai e diminuem quando o número de receptores aumenta na membrana (HUA *et al.*, 1998; TIEMAN *et al.*, 2000). Kevany *et al.* (2007) observou que o aumento nos níveis de expressão de mRNA dos genes de NR, ETR4 e ETR6 no início do amadurecimento de tomates, não foi acompanhado do aumento dos níveis de suas proteínas, mas sim do decréscimo das mesmas. Tal fato foi relacionado, pelo autor, à exposição ao etileno. O hormônio, neste caso, ao se ligar ao receptor, induz a uma mudança na conformação da estrutura protéica, tornando-a suscetível à degradação via proteassomo 26S e portanto, os níveis protéicos decaem.

Isso acontece por que, uma vez que o etileno se liga ao receptor, este não será mais capaz de reprimir as respostas ao hormônio e, sendo assim, é degradado. Como consequência, a transcrição dos respectivos genes aumenta e ocorre ressíntese de novos receptores para a reposição das proteínas degradadas (KLEE, 2002).

A expressão dos genes de receptores durante o desenvolvimento / amadurecimento também parece variar de modo particular em cada fruto. Caquis expressam ETR1 em níveis

basais durante todo o desenvolvimento e níveis aumentados de ERS1 e ERS2 no climatério; já presença de etileno regula negativamente a expressão de ETR1 em kiwi e níveis aumentados de ERS1, ETR2 e ETR3 durante o climatério (YIN *et al.*, 2008, PANG *et al.*, 2007).

Um controle fino como este parece ser fundamental para o controle da ação de etileno; outros hormônios, no entanto, possuem maneiras distintas de regulação. No caso das auxinas, enzimas de conjugação e/ou oxidação parecem ser fundamentais para o controle dos níveis endógenos e, conseqüentemente da ação do hormônio.

1.5 AUXINAS: BIOSÍNTESE E SINALIZAÇÃO

A idéia de que outros hormônios vegetais podem interagir com o etileno no amadurecimento é reconhecida há décadas, haja vista os experimentos de Nitsch (1955) e as auxinas no amadurecimento de morangos ou de Vendrel (1969) sobre auxinas e o amadurecimento de bananas. Contudo, os mecanismos pelos quais tais hormônios alteram vias metabólicas tão específicas, como da síntese de antocianinas ou da degradação de amido ainda são pouco compreendidos. Observações como estas têm despertado interesse da comunidade científica em compreender a ação de outros fatores associados ao etileno, e dentre os mais prováveis, *crosstalk* entre etileno e o ácido indol-3-acético (AIA).

O AIA foi o primeiro hormônio vegetal descoberto e está relacionado às mais diversas mudanças que ocorrem em plantas em desenvolvimento desde a organogênese, morfogênese, reprodução, alongamento e diferenciação celular, gravitropismo, dominância apical, iniciação e diferenciação de tecidos vasculares, desenvolvimento de sementes até o amadurecimento de frutos (DAVIES, 1995). Quanto a este último item, estudos em bananas e pêras pré-climatéricas apontam que AIA age como um fator de resistência à ativação de algumas vias metabólicas características do amadurecimento (PURGATTO *et al.*, 2001, FRENKEL E DICK, 1973)

A síntese deste hormônio é realizada no meristema caulinar, em folhas jovens, sementes e frutos em desenvolvimento (KERBAUY, 2005), a partir de vias dependentes de triptofano ou de seu precursor, o antranilato, e inclui a participação de diversas enzimas (Figura 4).

Figura 4: Modelo de biossíntese de auxinas. Adaptado de Tamas e Perrot-Rechenmann (2010). TRP: triptofano; IPA: ácido indol 3-pirúvico; TAM: triptamina; IAAId: Indol 3-acetaldeído; HTAM: n-hidroxitriptamina; IAM: indol 3-acetamida; IAOx: indol 3-acetaldoxime; IAN: indol 3-acetonitrila; CL: camalexina; IG: indolilmetil-glicosinolato; AMI1: codifica para indol 3-acetamida hidrolase; CYP79B2,3; TAA1: triptofano aminotransferase de *Arabidopsis*; YUC: YUCCA, uma *flavin monooxygenase-like proteins*; NIT: nitrilase; SUR1,2: genes que codificam para enzimas de síntese de IG.

A proteína YUCCA (YUC) parece ser a limitante nesta rede biossintética. Estudos baseados na superexpressão do gene YUC em *Arabidopsis thaliana* (ZHAO *et al.*, 2001) e arroz (YAMAMOTO *et al.*, 2007) depararam-se com altos níveis endógenos de AIA, o que indica que YUC catalisa um passo importante da síntese de AIA dependente de triptofano.

Em relação aos níveis endógenos de AIA no vegetal, sabe-se que são controlados por reações de conjugação ou oxidação, as quais podem inibir temporária ou irreversivelmente a ação hormonal (BANDURSKI, 1995). Por exemplo, a conjugação do ácido indol-3-acético com leucina, alanina, peptídeos, açúcares ou formação de ácido indol-3-butírico é reversível por hidrólise ou β -oxidação, ao passo que a conjugação com os aminoácidos glutamato e aspartato é irreversível (OSTIN, 1998). Foi visto que a presença de altas concentrações de auxina no vegetal estimulam um gene denominado GH3, o qual codifica enzimas de conjugação com aspartato e glutamato nos primeiros 5 a 60 minutos de tratamento com o hormônio (STASWICK, 2005). Outra via que o vegetal se utiliza para equilibrar os níveis de AIA é a oxidação irreversível de AIA em OxAIA (OSTIN, 1998).

O transporte de auxina pode ser feito ao menos de 3 maneiras, através do floema, que permite o deslocamento do hormônio de grandes quantidades a grandes distâncias; passivamente; e célula a célula, também denominado transporte polar, um modo mais refinado e que permite um controle maior do conteúdo hormonal que entra e sai da célula (DAVIES, 1995).

A percepção da auxina pelo vegetal depende de inúmeras interações moleculares e ainda hoje não se tem total esclarecimento sobre todas as etapas de sinalização deste hormônio, a começar pelo receptor. Duas proteínas têm mostrado atividade de receptor para auxina em vegetais, a *AUXIN BINDING PROTEIN 1* (ABP1) e a *TRANSPORTER*

INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1). Elas agem independentemente uma da outra, desencadeando diferentes respostas. A Figura 5 propõe como se dá a sinalização de auxina dentro da célula vegetal:

Figura 5: Mecanismo hipotético vigente de percepção da auxina. Adaptado de Weijers e Jüergens (2004). A principal via de percepção à auxina pelo tecido envolve sua ligação com a proteína TIR1, parte do complexo SCF^{TIR1} (formado por TIR1, ASK1 e CUL1). Este complexo é responsável por ubiquitinar as proteínas AUX/IAA, que agem reprimindo as Auxin Response Factors (ARF), reguladoras da transcrição de genes de resposta a auxina. Através do sistema proteossomo 26S, as proteínas ubiquitinadas são degradadas e as ARF passam a agir inibindo ou ativando a transcrição de genes responsivos à auxina.

Inúmeros trabalhos discutem a localização de ABP1 dentro da célula vegetal, e apontam para a possibilidade desta proteína, frente a diferentes estímulos, estar presente tanto no retículo endoplasmático quanto na membrana plasmática, onde assume seu papel de receptor (TIAN *et al.*, 1995; JONES e HERMAN, 1993; DEIKMANN *et al.*, 1995). A proteína tem sido relacionada às respostas precoces da auxina no desenvolvimento vegetal, como divisão, alongamento celular e polaridade do embrião.

A proteína TIR1, diferentemente de ABP1, localiza-se no núcleo e é parte de um complexo do tipo SCF-ubiquitina ligase que, na presença de auxina, reconhece nas proteínas AUX/IAA, uma sequência *degron* no domínio II denominada GWPPV/I (GRAY, 2001)

As AUX/IAA agem reprimindo as respostas às auxinas. Trata-se de uma proteína com quatro domínios bastante conservados e cujos domínios III e IV interagem com os domínios III e IV das *AUXIN RESPONSE FACTORS* (ARF), inativando-as (KIM, 1997) (Figura 6). As ARFs, são elementos que possuem a capacidade de se ligar ao DNA em regiões específicas denominadas *AUXIN RESPONSE ELEMENTS* (ARE) estimulando a transcrição de genes de resposta à auxina se possuírem em sua estrutura uma região média rica em glutamina, serina ou leucina ou reprimindo, se a mesma região exibir serina, prolina ou glicina (TIWARE,

2003). Na figura 6, que segue, podemos visualizar como ocorre a interação entre os domínios III e IV de AUX/IAA e ARFs:

Figura 6: Interação entre AUX/IAA e ARF através dos domínios III e IV da estrutura de AUX/IAA, que contém a região TGTCTC, denominada ARE com a região dos domínios III e IV dos ARF, inativando-os e impedindo a transcrição de genes de resposta à auxina. Adaptado de Quint e Gray (2006).

Na presença de auxina, estabelece-se uma ponte molecular aumentando a interação do domínio II de AUX/IAA com o complexo SCF^{TIR1}. Este complexo é formado pelas proteínas Cullina/CDC53 e RBX/ROC1, que juntas agem catalisando a síntese de polímeros de ubiquitina; SKP1, que age como uma ponte para a interação entre Cullina/CDC53 e RBX/ROC1; NEDD8/RUB1, cuja conjugação aumenta a atividade do complexo e, finalmente, a proteína Fbox, TIR1, que especifica o alvo a ser marcado para degradação (CRAIG, 2009; FURUKAWA, 2000). Uma vez que o polímero de ubiquitina é formado com a AUX/IAA, seu destino mais provável é o reconhecimento e a degradação pelo proteassomo 26S, um complexo de proteases ATP-dependente.

Pouco se sabe sobre as diferentes afinidades entre as várias TIR1 e os distintos AUX/IAA. A Figura 7 ilustra como as interações entre TIR1, AUX/IAA e ARFs na ausência e presença de auxina.

Figura 7: Modelo simplificado da interação entre TIR1 e AUX/IAA. Em (A) interação entre Aux/IAA e ARF na ausência de auxina. Em (B) auxina age como uma ponte molecular entre AUX/IAA e SCF^{TIR1}. A ação do proteassomo 26S sobre as AUX/IAA ubiquitinadas resulta em liberação dos ARFs. Adaptado de Tromas e Perrot-Rechenmann (2010).

1.6 REGULAÇÃO POR ETILENO E AUXINA DO METABOLISMO AMIDO-SACAROSE

O etileno apresenta correlação com alterações na atividade e na expressão gênica de β -amilase e de DPE2 de bananas, ao menos parcialmente. Isto foi observado após o tratamento de frutos de bananeira com 1-metilciclopropeno (1-MCP) e a constatação de que a atividade e/ou a expressão de ambas as enzimas foi claramente afetada (MAINARDI, 2007). Além do ritmo de degradação de amido ter se mostrado diminuído nos frutos tratados, a β -amilase apresentou baixa atividade durante todo o desenvolvimento, assim como níveis de mRNA reduzidos. Exceto ao final do experimento, os níveis de transcritos de β -amilase apresentaram ligeiro aumento, não acompanhado, no entanto, de alteração na atividade da enzima. No caso de DPE2, foi observada inibição de atividade durante todo o desenvolvimento dos frutos tratados com 1-MCP, que segundo o autor, deve se correlacionar com a atividade reduzida de β -amilase (MAINARDI *et al.*, 2006).

Nos mesmos frutos, Vieira Jr *et al.* (2006) observaram antecipação do pico de atividade e dos níveis protéicos e de transcritos de β -amilase em bananas tratadas com etileno. Nascimento *et al.* (2006) igualmente observaram a dependência da expressão e atividade de β -

amilase por etileno, quando da aplicação exógena do hormônio e seu antagonista, o 1-MCP, em bananas.

Em outros frutos a dependência do metabolismo amido–sacarose pelo etileno também foi descrita, como em kiwis, nos quais o etileno induziu a atividade de α -amilases, acelerando a hidrólise do amido com aumento concomitante no conteúdo de hexoses (ZHANG *et al.*, 2004).

Além do etileno, trabalhos anteriores mostraram que a complexa regulação de β -amilases envolve estresse abiótico, luz, alta concentração salina, açúcares- fatores que podem alterar a expressão e a atividade da enzima (SEKI *et al.*, 2001, HARMER *et al.*, 2000). Maeo *et al.* (2001), observaram indução de β -amilase de batatas por açúcares; Kaplan e Guy (2004) mostraram que a expressão e atividade de β -amilase de *Arabidopsis thaliana* exposta a extremos de temperatura foi alterada. Também em *Arabidopsis thaliana*, Harmer *et al.* (2000) viram que o acúmulo de transcritos de β -amilase é sincronizado com o ritmo circadiano da planta, sendo maior durante o dia, declinando com a noite.

Outros hormônios também tiveram seus efeitos avaliados sobre o metabolismo de amido em bananas. A infiltração de giberelinas (ROSSETO *et al.*, 2004) na polpa foi capaz de atrasar o início da degradação do amido, temporalmente correlacionado com a inibição da expressão de β -amilase; trabalhos realizados com ácido indol-3-acético igualmente mostraram a forte influência da auxina em inibir a degradação do amido em bananas. Purgatto *et al.* (2001; 2002), demonstraram que altos níveis de hormônio infiltrado na polpa de banana afetaram o metabolismo de amido, promovendo atraso temporal na degradação do carboidrato. No mesmo trabalho também foi observada a inibição da transcrição do mRNA de β -amilase e atraso no aumento de atividade da enzima. A influência do AIA sobre a expressão e atividade da DPE2, no entanto, ainda não foi relatada na literatura.

Embora haja um longo histórico que demonstre efeitos de auxinas sobre processos específicos do amadurecimento de frutos e também de sua possível interação com o etileno, são escassos os aprofundamentos sobre os mecanismos moleculares envolvidos. Embora ainda hajam muitos pontos a serem esclarecidos, o acúmulo de informações permite melhor postular como tais hormônios podem interagir no controle do amadurecimento de frutos e, particularmente, no metabolismo de carboidratos.

Frente às evidências da literatura que mostram que etileno estimula a degradação de amido, via diversas enzimas, entre elas β -amilase e DPE2 e que AIA retarda a degradação de amido via alteração da expressão e atividade de β -amilase, é sugerida a existência de um

mecanismo de correção entre etileno e auxina, que determina o início, o desenvolvimento e a intensidade do processo de degradação de amido em frutos.

O modo como esta correção acontece é um dos focos deste trabalho. Várias possibilidades existem para isso, seja pela ação de AIA sobre a via de sinalização de etileno, reconhecido como principal coordenador dos eventos do amadurecimento ou através da regulação direta de genes do metabolismo de degradação de amido.

A primeira hipótese está apoiada em dados de trabalhos os quais indicam que diferentes tipos de receptores estão presentes nas distintas etapas do desenvolvimento de frutos, promovendo respostas diversificadas frente à presença do etileno. Em tomates, foi observado que durante o amadurecimento, receptores do tipo NR aumentam progressivamente até o desenvolvimento total da coloração vermelha da polpa; da mesma maneira, os níveis de LeETR4 aumentam nesta fase e perfazem a maior parte do mRNA de receptores destes frutos (TIEMAN E KLEE, 1999). De outro lado, a literatura apresenta precedentes que demonstram que auxinas são capazes tanto de estimular como inibir a expressão de certos receptores de etileno. Em maçãs MdERS1 e MdERS2 tiveram a expressão estimulada frente ao tratamento com NAA (LI E YUAN, 2008) e em pêssegos, o receptor ETR2 teve os níveis de transcritos diminuídos frente ao tratamento com AIA (TRAINOTTI *et al.*, 2007).

Partindo destes antecedentes da literatura, o presente trabalho levanta a hipótese de que AIA possa alterar a sensibilidade do tecido ao etileno, através da modulação da expressão de genes de determinados tipos de receptores de etileno na banana, primeiro passo da via de sinalização deste hormônio. Deve se considerar, no entanto, que o ponto de regulação exercido por AIA pode se concentrar em outra parte da cascata de transdução de sinal do etileno.

A segunda hipótese, relaciona o controle direto do AIA sobre a expressão da β -amilase e DPE2. ASTORINO FILHO (2008) identificou a presença de uma sequência responsiva a AIA no promotor do gene de β -amilase, o que pode indicar ser este um ponto importante de convergência da ação de etileno e AIA sobre o metabolismo de amido em banana. Os dados de atividade e transcritos do gene de β -amilase associados aos perfis de receptores de etileno permitirão compreendermos com maior clareza a influência de auxina na regulação desta enzima.

A inclusão da DPE2 neste estudo vai ao encontro de trabalhos (SMITH, 2005) que apontam esta enzima como fundamental para a degradação do amido transitório em folhas. O fato de sua presença ter sido detectada em bananas, por si só, traz importantes implicações para o estabelecimento de um modelo de degradação de amido em frutos. O modelo que

emerge, neste caso, teria grandes semelhanças com o encontrado em folhas, porém é factível supor que sua regulação seja completamente diferente, dado que são órgãos distintos com funções distintas, e cuja degradação do amido tem propósitos específicos.

Comparativamente ao conhecimento acumulado sobre o metabolismo do amido em cereais, tubérculos e folhas, em frutos tal processo ainda é pouco conhecido. Compreender estas correlações supracitadas, do ponto de vista da pesquisa básica, traz subsídios não apenas para o estudo do metabolismo de carboidratos na banana, mas também de outros frutos que acumulam amido como carboidrato de reserva. Do ponto de vista da pesquisa aplicada, o entendimento sobre o metabolismo de amido permite compreender e aprimorar aspectos de qualidade do fruto, como o sabor e a textura, intimamente relacionados ao carboidrato.

O melhor entendimento sobre a regulação do metabolismo amido-sacarose permite o direcionamento de programas de melhoramento genético que visem à obtenção de bananeiras, cujos frutos apresentem características diferenciadas quanto ao teor final de açúcares. Também, tais esclarecimentos podem influenciar no manejo pré e pós-colheita, buscando estratégias que resultem em frutos mais ou menos doces, conforme o desejado.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar se o mecanismo pelo qual o AIA promove alterações enzimáticas ligadas ao metabolismo do amido em bananas se dá por meio de alterações na percepção ao etileno, via modificação da transcrição dos genes de receptores de etileno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 FRUTOS E INFILTRAÇÃO EM FATIAS DE BANANA

As bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) utilizadas para infiltração de AIA, foram obtidas na CEAGESP de São Paulo (SP) com 4 dias pós-colheita e selecionadas a partir de diâmetro médio de 35 mm na região equatorial do fruto. Cada banana foi lavada com água corrente, mantida por 1 minuto em solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) para redução da carga microbiana superficial, lavadas novamente com água corrente e secas.

Para a infiltração de AIA, utilizou-se como base o método de PURGATTO *et al.* (2001). Fatias de bananas foram cortadas da porção central do fruto com aproximadamente 6mm de espessura, utilizando uma lâmina de aço inoxidável. As mesmas tiveram seu peso anotado e foram divididas em béquer contendo solução de manitol 120mM, para compor o controle, e béquer contendo solução de manitol 120mM acrescido de AIA 100uM, para compor o grupo tratado com o hormônio. Para o experimento utilizando ACC, as soluções de testes foram compostas de 120mM de manitol, para compor o controle e por solução 120mM de manitol acrescido de ACC 100uM, para compor o grupo ACC e solução 120mM de manitol acrescido de ACC100uM e AIA 100uM para compor o grupo AIA+ACC.

A partir disso, os mesmos procedimentos foram adotados para ambas as amostragens. O béquer foi introduzido dentro de um dessecador e as fatias foram submetidas a 60s de vácuo para que seu peso inicial aumentasse em 5%, no mínimo. Em seguida, as fatias, foram acondicionadas em potes de vidro de 500mL contendo no fundo uma camada de bolas de vidro, previamente autoclavados. Para manter a umidade relativa dentro dos frascos em torno de 85%, 10 ml de água destilada foram adicionados no fundo dos potes.

Cada grupo (controle e tratado) era composto por 6 potes contendo 14 fatias em cada. Estes foram mantidos a 20°C e ventilados com ar (fluxo de 1L/h) tratado com KOH 20% (m/v) para a remoção de CO₂. Os frutos tiveram seu desenvolvimento e amadurecimento acompanhados até a observação de que todo o amido havia sido degradado nas fatias. Neste período, amostras foram coletadas em espaços de 24 horas (3 fatias, cada uma retirada de potes diferentes) descascadas, tiveram a película superficial da polpa removida e posteriormente congeladas em N₂ líquido e armazenadas em freezer a -80°C. Todo o procedimento de preparo e amostragem das fatias foi conduzido em condições assépticas.

3.2 RESPIRAÇÃO E PRODUÇÃO DE ETILENO

A estimativa de CO₂ foi realizada após acumular-se o gás dentro dos potes herméticos durante 1 hora. Uma alíquota de gás do interior dos potes contendo as fatias foi tomado e injetado em um cromatógrafo a gás da Hewlett-Packard modelo GC-6890 equipado com detector de condutividade térmica. A coluna utilizada foi a HP-Plot Q (30 m, D.I. 0,53 mm).

As condições para a corrida cromatográfica foram: injeção com divisor de amostra (split) em taxa de 50:1 e temperatura de 250°C; volume de injeção 1ml; corrida isotérmica a 30°C empregando hélio como gás carreador em fluxo constante de 4ml/min; temperatura do detector em 250°C utilizando como referência fluxo de hélio a 7ml/min. A estimativa da quantidade de CO₂ foi feita em relação a injeção de 1 mL de padrão de CO₂ 326 nL/L em ar sintético da Air Liquid.

Para a análise de etileno, o gás foi acumulado dentro dos potes herméticos também por 1 hora, foi empregado o mesmo equipamento e a mesma coluna cromatográfica, porém com detecção por ionização de chama. O volume de injeção foi de 10 mL e para injetar tal quantidade de ar, foi empregado o modo de injeção *pulsed splitless*, desenvolvido pela Hewlett-Packard, opcional das válvulas de injeção com EPC utilizadas nos modelos de cromatógrafo a gás desta empresa.

As condições de injeção foram: pressão de 20 psi por 2 minutos, fluxo de ventilação de 5 ml/min após 30 segundos de injeção e temperatura do injetor em 200°C. As demais condições cromatográficas empregadas foram: corrida isotérmica a 30°C empregando hélio como gás carregador em fluxo constante de 1 ml/min; temperatura do detector em 250°C, fluxo de ar e hidrogênio no detector em 450 ml/min e 50 ml/min, respectivamente. A estimativa da quantidade de etileno produzida pelos frutos foi feita em relação a injeção de um padrão de 0,1 nL/L de etileno em ar sintético da Air Liquid.

3.3 AMIDO E AÇÚCARES SOLÚVEIS

O teor de amido foi determinado enzimaticamente pelo método descrito por Arêas e Lajolo, 1980. O amido foi extraído com hidróxido de sódio 0,5N, neutralizado com ácido acético 0,5N, precipitado com etanol 80%, hidrolisado com amiloglicosidase e a glicose liberada determinada pelo sistema glicose oxidase/peroxidase/ABTS, segundo método de Bergmeyer, 1974. Para o cálculo foi utilizada uma curva-padrão de glicose.

Os açúcares solúveis foram extraídos com etanol 80% a 80°C por três vezes, os sobrenadantes combinados e o volume levado a 25 mL. Metade do extrato total do balão foi evaporado em concentrador a vácuo a 45°C e o volume reconstituído com 1 mL de água. A outra metade, também submetida à evaporação, foi reconstituída em 1mL de etanol e guardada em freezer -20°C para necessidade de eventuais repetições. Os açúcares solúveis foram determinados por cromatografia à líquido com detecção por amperometria de pulso em um sistema Dionex DX-500, equipado com coluna Carbopac PA1 (4×250mm) em corrida isocrática com fluxo de 1mL/min de NaOH 18mM, durante 25 min (MAINARDI *et al.*, 2006).

3.4 DETERMINAÇÃO DE AIA LIVRE

A extração de AIA livre foi feita segundo o método de LUDWIG-MÜLLER *et al.* (2008), com algumas modificações.

Foram pesados cerca de 100 mg das amostras trituradas em N₂ líquido, diretamente em um tubo de 2 mL contendo 500 µL de mistura de extração composta por isopropanol:ácido acético 95:5. Adicionando-se, em seguida 1 µg de padrão marcado [¹³C₆] ácido indol-3-acético(C-IAA) (Cambridge Isotopes). A mistura foi agitada em vórtex por cerca de 1 min e transferida para agitação a 4°C por cerca de 2 horas em banho-seco. O homogenato foi centrifugado por 10 min. a 14.000 X g a 4°C. O sobrenadante foi coletado com micropipeta e transferido para um novo microtubo. O volume foi reduzido em fluxo de N₂ até restar apenas cerca de 20-50 µL. O pH foi verificado com uso de fita e ajustado entre 3.5 e 2.5 utilizando HCl 1N. Foram adicionados 500 µL de acetato de etila na amostra e em seguida agitadas em vórtex por cerca de 1 min e centrifugadas por 5 min. a 14.000 X g a 4°C. A fase superior foi coletada com auxílio micropipeta e transferida para um novo microtubo. As etapas de extração com acetato de etila foram repetidas mais duas vezes no extrato aquoso. As frações orgânicas foram combinadas e secas completamente em fluxo de N₂. A amostra foi ressuspensa com 100 µL de metanol e transferida para o inserto do vial de injeção para CG. Foram adicionados 50 µL de trimetilsilil-diazometano e o frasco foi fechado imediatamente e mantido a temperatura ambiente por 30 minutos. A amostra foi seca novamente em fluxo de N₂, ressuspensa com 20µL de acetato de etila e levada para análise por CG-MS. Através de injetor automático (Agilent modelo ALS 7683) foi injetado 1 µL da amostra em modo Splitless.

O equipamento utilizado foi o cromatógrafo a gás Hewlett-Packard modelo 6890 acoplado a detetor por espectrometria de massa modelo 5973. A coluna utilizada para as separações foi a HP-1701 (30 m, D.I. 0,25 mm, 0,50 μ m de espessura do filme interno) tendo hélio como gás carreador, com fluxo de 4 mL/min.. A coluna foi mantida a 150 °C por 3 minutos, seguida de rampa de temperatura de 5 °C/min até 210 °C e 15 °C/min até 260 °C. Foram monitorados os íons com relação massa/carga (m/z) em 130 e 189 (correspondentes ao AIA endógeno) e 136 e 195 (correspondentes ao padrão interno de [$^{13}\text{C}_6$]-AIA). As concentrações endógenas de AIA foram obtidas pela relação entre as áreas dos picos nos cromatogramas extraídos em m/z 130 e 136.

3.5 PREPARAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO

Para a atividade de β -amilase, as polpas de bananas congeladas (-80°C) foram trituradas na presença de N_2 líquido em gral de porcelana. Utilizou-se para a extração a proporção 1:4 entre amostra e solução extratora contendo Hepes-KOH 50 mM pH 7,0, cisteína 20 mM, benzamidina 1 mM, polivinilpirrolidona 40000 (PVP 40) 1% (m/v) e 20 mM de EDTA. A solução extratora utilizada para a obtenção dos extratos para as atividades DPE2 compreendeu os mesmos reagentes, exceto pelo tampão Hepes-KOH 50 mM cujo pH empregado foi 7,5. Os extratos obtidos, após a homogeneização, para cada uma destas extrações, foram centrifugados a 10000 rpm por 15 minutos e os sobrenadantes recolhidos e utilizados nos ensaios de atividades.

3.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

As determinações de proteína foram feitas pelo método de Bradford (1976), com leitura em espectrofotômetro a 595 nm, utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

3.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.7.1 Atividade enzimática de β -amilase

A atividade β -amilásica foi medida utilizando 20uL do reagente Betamyl (Megazyme International Ireland, Ltd) composto do substrato p-nitrofenil-maltopentaosídeo e 20uL do

extrato enzimático. O meio de reação, contendo o extrato enzimático, foi incubado em microplacas de 96 poços na câmara de leitura do espectrofotômetro (Benchmark Plus, Bio-Rad, CA), a 30°C por 30 min. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 160uL de Tris 1%. A absorbância do *p*-nitrofenol, liberado do substrato, foi lida no mesmo aparelho a 410 nm e a concentração calculada com base em curva-padrão de *p*-nitrofenol.

3.7.2. Atividade enzimática de DPE2

O ensaio de atividade de DPE2 foi realizado utilizando-se PAGE em condições não desnaturantes. Para os géis de separação foram utilizados 7,5% de acrilamida/ bis-acrilamida (30:0,8), 375 mM de Tris-HCl pH 8,8 e 1,0% (p/v) de glicogênio de ostra; para os géis de empilhamento utilizou-se 3,75% de acrilamida/ bis-acrilamida e 62,5 mM de Tris-HCl. Testes foram realizados para se determinar a quantidade ótima de proteína para o ensaio de atividade enzimática, fixando-se 13ug de proteína para cada replicata. Após a eletroforese (15 mA/gel, temp. 4 °C), os géis foram lavados duas vezes, durante 15 minutos, com 40 mL de uma solução contendo Tris 100 mM pH 7,0, MgCl₂ 1mM, EDTA 1 mM e DTT 1 mM e então foram incubados por 16 horas à 25 °C em 40 mL do meio anteriormente descrito acrescido de maltose 5mM. Para interromper a reação e corar os géis, foi utilizada solução de I₂ 0,67% (p/v) + KI 3,33% (p/v). Os géis foram digitalizados no aparelho VersaDoc™ Imaging System e as imagens analisadas com o software Quantity-One v. 1.4 (BioRad, CA).

3.8 ANÁLISE DE NÍVEL DE TRANSCRITOS POR QRT-PCR

3.8.1 Extração de RNA, purificação, síntese de cDNA.

Três extrações independentes de RNA total foram feitas para cada ponto do amadurecimento utilizando-se a polpa congelada das bananas controle e infiltradas com AIA. Para isso, foi utilizado o reagente Concert™ Plant RNA da empresa Invitrogen, seguindo-se as instruções do fabricante.

Após a extração do RNA, as amostras foram purificadas com o kit Ambion® DNA-free™ DNase Treatment & Removal Reagents para remoção de traços de DNA presentes na amostra a partir do tratamento com DNase, seguindo-se o protocolo recomendado.

Em seguida, foi feita a quantificação do RNA presente nas amostras, utilizando-se espectrofotômetro (Nanodrop2000c), tomando como ideal a relação $1,8 \leq A_{260/280} \leq 2,0$.

Também foi avaliada a qualidade do RNA total em gel de agarose 1%. As amostras foram misturadas ao corante GelRed (Qiagen) diluído (1:500) e a qualidade foi avaliada pela aparência das bandas dos RNAs ribossomais.

O RNA foi convertido em cDNA de fita simples, para as reações de PCR em tempo real, através de reação de transcrição reversa com *primer* Oligo(dT) a partir do kit *ImProm-II™ Reverse Transcription System* da empresa Promega, seguindo-se as instruções do fabricante.

3.8.2 *Primers* utilizados na amplificação dos genes codificadores dos receptores de etileno de bananas

Os *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real referentes aos genes de receptores de etileno MaERS1, MaERS2, MaERS3, MaETR1 e do controle de reação MaACTINA (Tabela 1), foram obtidos a partir do trabalho de CHIEBAO (2011).

Tabela1: Sequência de nucleotídeos e tamanho esperado para o produto de amplificação dos genes que codificam os receptores de etileno ERS1, ERS2, ERS3, ETR1 e do gene da Actina de *Banana*, cv Nanicao (CHIEBAO, 2011).

Nome do Gene	<i>Amplicon</i>	Sequência	
ERS1	228pb	Forward	5'-CGGTGCCTTCATTGTTCTTTG-3'
		Reverse	5'-CCCATCTCCCTATCAAGTTC-3'
ERS2	86pb	Forward	5'-CTATGGGTTACCTTAGCAGCA-3'
		Reverse	5'-CTGACTGAGAGCTCTTCTC-3'
ERS3	151pb	Forward	5'-CGCACTTGCTTACTTCTCCA-3'
		Reverse	5'-CACGGTAAAGGTCCACAAG-3'
ETR1	90pb	Forward	5'-AGGAGAAAGAGCTCTCAGTC-3'
		Reverse	5'-GGTTGGACGCAGCAAGAAT-3'
Actina	134pb	Forward	5'-TGACGACATTCAGCCTCTTG-3'
		Reverse	5'-TTCCGACCATCACACCAGTA-3'

3.8.3 Desenho dos *primers* para os genes codificadores de β -amilase e DPE2

Todas as sequências foram desenhadas a partir do auxílio dos softwares disponíveis na internet – Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net>) ou Primer-Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast), levando-se em consideração os seguintes parâmetros: tamanho do produto: 100 a 200 pb; tamanho do *primer*: 18 a 22pb; temperatura de *melting*: 57° a 63° C; quantidade de CG: 40 a 60%.

Para avaliação da qualidade do *primer*, utilizou-se a ferramenta *Oligo Analysis* (<http://www.operon.com/>) para verificação da formação de estruturas secundárias.

A partir da plataforma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponível no site do National Center for Biotechnology Information – NCIB – (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), verificou-se a especificidade do *primer* em reconhecer β -amilase de *Musa accuminata* e, no caso de DPE2, cuja sequência ainda não está disponível no banco de dados, utilizou-se como critério de seleção o não reconhecimento de outras sequências de *Musa spp* encontradas no GenBank.

Os *primers Reverse e Forward* da enzima β -amilase (tabela 2) foram desenhados a partir das regiões correspondentes ao mRNA, obtidas da sequência completa do gene disponível no genbank (nº acesso: GU734792.1), adicionada por Astorino-Filho, R., Nascimento, J.R.O. and Lajolo, F.M. (2010).

Tabela 2: Sequência de nucleotídeos, região amplificada e tamanho esperado para o produto de amplificação dos genes que codificam as enzimas β -amilase (MaBAM) e DPE2 (MaDPE2) de *Banana*, cv Nanicão.

Nome do gene	Tamanho do <i>primer</i> (pb)	Tamanho esperado do amplicon (pb)	Sequência de nucleotídeos
MaBAM	19	142pb	F - CATAGGATGGGTGCTGAGT
	19		R - TCTCGGTCATTCCCAGGAA
MaDPE2	19	95pb	F - TGCTTGGTGGGAGGAAGAT
	19		R - TTCTGTGGTGCAACGAGGA

O fragmento amplificado pelos *primers* MaBAM é mostrado a seguir. As regiões sublinhadas indicam o local de ligação dos *primers Forward e Reverse* (dos pares de base 1559 a 1701).

5'-
CATAGGATGGGTGCTGAGTTCTTCTCTCCGGATCACTGGCCGCTGTTTACCGAGTTCATCAGGAGCA
TGGCGCAGCCGAGATGGAGAAAGATGATATCCCCAGCAACTTGGAAGGTTGTCACTCTCTATCA
ATCAGTTTCTGGGAATGACCGAGA-3'

Os *primers* MaDPE2 foram desenhados a partir de um fragmento do mRNA de DPE2, determinado em trabalho anterior realizado pelo grupo, porém não publicado. A sequência

correspondente ao fragmento está disponibilizada a seguir, com a indicação das regiões de ligação dos *primers* desenhados.

5'- AATTGGGTTTAATTGGTTTACGCATTTCAGAGAATGCCTAGTGAACCGGACGTGGAATTT
GGTATACCATCTCAATACAGCTATATGACTGTCTGTGCACCATCTTGCCATGACTGCTCCACC
ATGCGTGCTTGGTGGGAGGAAGATGAAGAGAGAAGATGTCGTTATTATATAAGTGTTGCTG
GATGCAATGATATGCCGCCTTCCTCGTTGCACCACAGAAGTAGCATACTTCATCATTTCAGCAA
CACATGCAAGCTCCATCGATGTGGGCAATTTCCCTCTTCAGGACTTGCTAGCACTAAGAGA
AGAATACACGACAAGACCAGCTGTGGAGGAGACAATCAATGACCCAACCAACCCGAAGCAT
TACTGG -3'

Os *primers* escolhidos (tabela 2) foram desenhados a partir do fragmento anteriormente mostrado e correspondente à região 3' do gene de DPE2.

Todos os *primers* sintetizados (Sinapse do Brasil), tiveram a eficiência determinada e as concentrações de uso nas reações, tanto de *primer* quanto de amostra, otimizadas.

3.9 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL

As reações de PCR em Tempo Real foram feitas utilizando-se Kit *Platinum® SYBR® Green* qPCR SuperMix-UDG e termociclador Rotor-Gene 3000 four channel Multiplexing System (Corbett Research). As reações foram feitas de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras foram testadas em triplicata, juntamente com um controle positivo da reação (pool de amostras) e um controle negativo (NTC) . O padrão de ciclos x tempo x temperatura utilizado para as reações seguiu a o padrão 95°C por 10 min; 40 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min.

A ausência ou presença de DNA contaminante foi confirmada a partir da curva de dissociação realizada após os 40 ciclos, seguindo o esquema de ciclo, temperatura e tempo descritos anteriormente. Os valores de Ct para todos os genes foram normalizados utilizando-se aos valores de Ct da leitura do gene da actina de *Musa acuminata* (CHIEBAO, 2011) de cada amostra.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a infiltração do ácido indol-3-acético nas fatias de banana, o amadurecimento das mesmas foi acompanhado, sendo realizadas em paralelo as medidas de etileno e CO₂. Conforme mostra a figura 8, AIA não promoveu grandes alterações nas vias metabólicas de síntese de etileno ao longo do período acompanhado, nem nos requerimentos energéticos, traduzidos pelos níveis de CO₂ respiratório. Embora o pico de etileno tenha ocorrido dois dias antes nas fatias do grupo controle, esse não parece ter afetado significativamente o climatério respiratório; considera-se que os níveis produzidos pelas fatias tratadas com o AIA no DPI 6 e DPI7 já sejam suficientes para promover a sinalização de etileno, como deve estar ocorrendo no controle.

Figura 8: Efeitos do tratamento com AIA sobre a produção de etileno (I), respiração (II) e amido (III), em bananas cv. Nanicaõ pós-colheita controle e tratadas com AIA 100 µM. Para etileno e respiração, cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão (n=5) e para amido cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão (n=3).

A partir da análise das polpas, observou-se que a degradação de amido (Figura 8) se diferenciou entre os grupos, o que vai ao encontro de trabalhos anteriores que reportaram o efeito promovido por AIA especificamente neste metabolismo (VENDRELL, 1969; PURGATTO *et al.*, 2001). A partir do DPI4, ambos os grupos iniciam efetivamente a degradação do amido e o grupo tratado com AIA o faz mais lentamente; é possível observar que os níveis de degradação de amido no grupo são atingido cerca de 2 dias após o controle.

Para avaliar se AIA exerceu influencia sobre a β -amilase, uma enzima chave do processo degradatório, foram feitas análises da atividade enzimática e dos níveis de transcritos de seu respectivo gene. Para esta última análise, foram desenhados *primers* para reações de

PCR em tempo real, cujas sequencias podem ser avaliadas em Materiais e Métodos. A avaliação da eficiência e os valores otimizados para a concentração de cDNA e de *primer* utilizados nas reações de PCR em tempo real e estão dispostos na tabela 3.

Tabela 3: Resultados da eficiência e concentrações de cDNA e *primers* utilizadas nas reações de PCR em tempo real referente a enzima β -amilase de *Musa accuminata*, cv Nanicão.

Receptor	Eficiência	Concentração cDNA	Concentração <i>primers</i>
MaBAM	1,97	0,2ng/ μ L	50nM

A curva de dissociação (*melting curve*) é um dos parâmetros utilizados para avaliação da eficiência e especificidade dos *primers*. A figura 9 representa graficamente a dissociação referida e mostra amplificação de somente um tipo de fragmento:

Figura 9: Representação das curvas de dissociação referente ao *primer* MaBAM. As imagens foram obtidas do software Rotor Gene 6.0.

As análises realizadas com o PCR em tempo real contrapostas à atividade enzimática revelaram que AIA altera o tempo em que acontece o aumento de atividade da enzima e dos níveis de transcritos do gene de β -amilase.

A atividade da enzima possui perfil parecido (no que se refere ao nível de atividade máxima detectada) em ambos os grupos, mas o aumento de atividade, que se associa à aceleração no ritmo de degradação do amido ocorre posteriormente no tecido tratado com AIA. De acordo com a figura 10, a atividade de β -amilase nos frutos controle apresentou tendência de acréscimo já no DPI2, sendo mantido um padrão de incremento até o fim do período observado. Diferentemente, nos frutos tratados com AIA a atividade de β -amilase, do DPI 0 ao 6, permaneceu diminuída e estável havendo acréscimo abrupto a partir do DPI8.

Figura 10: Atividade enzimática (acima) e níveis de transcritos (abaixo) de β -amilase dos grupos controle e tratado com AIA 100 μ M. As barras verticais representam a média $\pm$ o erro padrão das análises realizadas.

No entanto, nos frutos tratados, embora haja um aumento de transcritos de β -amilase a partir do DPI 10, os mesmos estão cerca de 4 a 5 vezes menores que os encontrados no grupo controle (entre o DPI 4 e DPI 10).

Purgatto *et al.* (2001), demonstraram que o AIA afeta a atividade de β -amilase e dos níveis de transcritos do gene que codifica a enzima. No trabalho, a atividade nos frutos tratados com o hormônio apresentou acréscimo posterior ao controle, o que foi sincronicamente acompanhado pelo aumento dos transcritos. O perfil do presente trabalho que mostra incremento nos níveis correspondentes ao mRNA do gene de β -amilase posterior ao aumento de atividade no grupo tratado com AIA, pode revelar uma regulação complexa desta enzima, devendo ser considerados fatores de influência pós transcricionais. De acordo com Sparla *et al.* (2006), uma das isoformas de B-amilase (BAM1) de *Arabidopsis thaliana* foi detectada sendo ativada quando reduzida e desativada quando oxidada pelo sistema tioredoxina/ferredoxina existente no cloroplasto. Também, deve se considerar que, no presente trabalho, o período de acompanhamento do amadurecimento dos frutos foi mais extenso o que, portanto, pode revelar maiores detalhes do comportamento da enzima.

A partir da afirmação dos efeitos de AIA sobre o metabolismo de amido e sobre β -amilase, buscou-se avaliar se AIA também promoveria efeitos sobre outro ponto da via de degradação de amido: a enzima DPE2.

A enzima DPE2 foi identificada como responsável por clivar a maltose proveniente do amiloplasto em 2 resíduos glicosil e transferir um deles para um heteroglicano aceptor do citosol. De acordo com estudos anteriores, DPE2 parece ser a principal rota pela qual a

maltose do amiloplasto passa ao citosol e é convertida, ao final do processo, em sacarose (FETTKE *et al.*,2010).

Para avaliar se AIA exerce influencia sobre DPE2, foram realizados ensaios de atividade da enzima em Gel de poliacrilamida em condição não desnaturante e PCR em tempo real para averiguar mudanças no perfil de transcritos da enzima. Para esta última análise, foram desenhados *primers* para o gene, cujos resultados da avaliação de eficiência e otimização da concentração de cDNA e de *primer* utilizados nas reações de PCR em tempo real seguem disponibilizados na tabela 4.

Tabela 4: Resultados da eficiência e concentrações de cDNA e *primers* utilizadas nas reações de PCR em tempo real referente a enzima DPE2 de *Musa accuminata*, cv Nanicão.

Receptores	Eficiência	Concentração cDNA	Concentração <i>primers</i>
MaDPE2	1,99	1ng/ μ L	100nM

A curva de dissociação (figura 11), mostra amplificação de somente um fragmento, o que indica a especificidade do *primer*:

Figura 11: Representação das curvas de dissociação referente ao *primer* MaDPE2. As imagens foram obtidas do software Rotor Gene 6.0.

A atividade da enzima foi inibida nos frutos tratados e parece condizente com as alterações no padrão de degradação de amido (Figura 12). A inibição da síntese de maltose nestes frutos reforça a coerência com os resultados de atividade de ambas as enzimas, β -amilase e DPE2.

Figura 12: Atividade enzimática (acima) e níveis de transcritos de DPE2 (abaixo) dos grupos controle e tratado com AIA 100 μ M. As barras verticais representam o desvio padrão das análises realizadas (n=3).

Como os níveis de maltose estão diminuídos nos frutos tratados (figura 13), não se pode descartar a possibilidade disso influenciar a atividade da enzima DPE2, uma vez que sua atividade pode ser dependente da disponibilidade de substrato. Ambas as proposições, da atividade de DPE ser alterada por AIA ou de ser alterada pela escassez de substrato, são possíveis e sendo assim, mais investigações são necessárias para identificar a exata regulação desta enzima.

Figura 13: Efeitos do tratamento com AIA sobre a síntese de maltose (I), glicose(II) sacarose(III) e frutose (IV), em bananas cv. Nanicão pós-colheita controle e tratadas com AIA 100 μ M. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Os níveis de transcritos, aumentados em ambos os grupos nos primeiros dias pós infiltração, foram sustentados por mais tempo nos frutos submetidos aos altos níveis do AIA. Curiosamente, o aumento dos níveis de transcritos observados no início nos primeiros dias de acompanhamento não se refletiram em aumento da atividade da enzima, o que indica a

existência de mecanismos de controle pós-transcrição envolvidos na regulação desta enzima, como por exemplo o sistema redox determinado pela atividade da enzima tireodoxina (BALMER *et al.*, 2006).

Quando analisados os níveis de açúcares solúveis, o aparente desbalanço metabólico promovido por AIA é reforçado. A figura 13 mostra que a diminuição no ritmo de degradação de amido se reflete até os últimos componentes da via, as hexoses glicose, frutose e sacarose, que apresentam níveis reduzidos nos frutos tratados com AIA.

O fato da β -amilase e da DPE2 serem ao menos parcialmente reguladas por etileno (VIEIRA JR, 2006; MAINARDI, 2007) aponta para que um dos possíveis mecanismos pelo qual AIA modifica o funcionamento destas enzimas seja a partir de uma ação não convencional de etileno sobre as mesmas.

Conforme já se sabe, o modo pelo qual etileno age no tecido depende de sua interação com receptores da membrana, os quais promovem a passagem do sinal específico à diversos componentes de uma via de transdução complexa. Visto tratar-se do primeiro nível da sinalização, optou-se por avaliar se AIA altera a transcrição dos genes destes receptores, alterando, assim, a percepção do tecido ao etileno.

Para entender os efeitos da infiltração de AIA em um tecido prestes a amadurecer, é importante lembrarmos que, uma vez que o fruto inicia seu programa de amadurecimento, diversas vias metabólicas são ativadas e desativadas, genes deixam ou passam a ser transcritos e traduzidos. Os níveis hormonais se alteram. Assim, no tecido pós-colheita em que foi infiltrado o ácido indol-3-acético, é esperado que as vias metabólicas referentes às etapas anteriores de desenvolvimento estejam inibidas, e as vias que tornam possível o que fisiologicamente se chama “amadurecimento” estejam ativadas. Ou seja, nestes tecidos, os mecanismos de controle dos níveis de AIA estão também ativados, o que promove a rápida conjugação e oxidação do hormônio na forma livre, apta a agir (Purgatto *et al.*, 2002).

Conforme mostra a figura 14, os altos níveis de auxina livre presentes no DPI0 (cerca de 100 vezes maior que no controle) logo apresentaram decréscimo, atingindo valores de 2ng/g já no DPI4. Concomitantemente, houve o início da alteração do ritmo de degradação de amido. Purgatto *et al.* (2002) observaram a rápida mobilização do excesso de AIA livre para conjugação com açúcares (AIA-éster) e aminoácidos (AIA-amida) após a infiltração de fatias de bananas pós colheita com 100 μ M de AIA. Em um período de 72 horas após a infiltração os altos níveis de AIA caíram para valores próximos do grupo controle (4 ng/g MF). É fato que apesar dos altos níveis de AIA livre tenham permanecido na polpa por pouco tempo, ainda assim foram suficientes para promover alterações no metabolismo de amido nas fatias.

Figura 14: Efeitos do tratamento com ácido indol-3-acético sobre os níveis de AIA livre na polpa de bananas cv Nanicaõ controle e tratadas com AIA 100 μ M (acima) e sobre a degradação de amido (abaixo) nos mesmos frutos. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão (n=3).

O AIA exerceu influência sobre a transcrição do mRNA de receptores de etileno, o que sugere ser este um ponto de *crosstalk* importante entre os dois hormônios (figura 15). De acordo com os resultados, as alterações mais expressivas ocorreram na transcrição do gene de MaETR1, que apresentou mudança de padrão, com níveis reduzidos quando comparado ao controle. Também o AIA parece ter influenciado a transcrição de MaERS3 nas fases finais do amadurecimento. Já os perfis do mRNA de MaERS1 e MaERS2 apresentaram-se similares para ambos os grupos, ao menos em nível transcripcional.

Figura 15: Efeitos do tratamento com AIA 100 μ M sobre a transcrição de genes dos receptores de etileno (I) MaERS1, (II) MaERS2, (III) MaERS3, (IV) MaETR1 de bananas cv Nanicaõ controle e tratadas. As barras verticais representam a média $\pm$ o erro padrão para cada ponto analisado.

Em relação ao MaETR1, é possível observar inibição da transcrição deste gene já no DPI 0. As amostras deste ponto foram congeladas cerca de 3 a 4 horas após a infiltração (devido à duração total do experimento) e mostram que já nos primeiros momentos de sua presença, o AIA promoveu mudanças em nível transcripcional.

Os perfis de transcritos para MaETR1 e MaERS3 observados no grupo controle do presente trabalho estão em acordo com os reportados por He *et al.* (2009) para os controles de experimentos que avaliaram o estresse térmico e o tratamento com propileno em bananas.

Supondo-se que a repressão da transcrição do gene deste receptor tenha conseqüências na quantidade da proteína receptora, a sinalização de etileno diferenciada por ETR1 pode ser responsável por ativação e inibição de fatores de transcrição diferentes do controle, e que vão coordenar diferencialmente a transcrição de genes. O envolvimento dos fatores de transcrição na resposta ao etileno frente à presença de auxina tem sido bastante estudada. O trabalho de El-Sharkawy *et al.*, 2009, mostraram haver em uma cultivar de ameixa japonesa 7 tipos de fatores de transcrição responsivos tanto a etileno quando a auxina e conforme apontam estudos de Purgatto *et al.*, 2012 (dados não publicados), a presença da auxina no tecido de tomates também é responsável por alterar uma gama de fatores de resposta ao etileno de uma maneira totalmente diferente de quando o fruto recebe outros estímulos. É importante frisar que, apesar das variações nos níveis de transcritos sugerirem alterações no montante das proteínas receptoras, análises específicas são fundamentais para a avaliação deste aspecto neste trabalho. Nem sempre a relação transcritos - proteínas é direta (KEVANY *et al.*, 2007).

Nos experimentos executados, foi visto também que a transcrição dos genes MaERS3 foi alterada. Enquanto no controle o mRNA de ERS3 apresentou aumento no final do período de acompanhamento, nos fruto tratados o mesmo não foi observado. É provável que, graças ao acontecimento tardio, esta mudança não traga impacto ao metabolismo degradatório de amido, mas sim esteja ligado a outros processos. Interessante notar que, embora os níveis de AIA tenham atingido os mesmos valores do grupo controle no 4º dpi, a redução na transcrição de MaERS3 perdurou até o final do período avaliado no experimento.

Frente aos resultados e das hipóteses levantadas pelo trabalho, pode-se dizer que a presença de auxina promoveu alteração nas enzimas β -amilase de DPE2 e também promoveu alteração nos níveis de mRNA de receptores de etileno. Para se avaliar se estes eventos ocorrem dependente ou independentemente um do outro, novos estudos devem ser realizados.

Como bem documentado, o metabolismo de amido é reconhecidamente coordenado por etileno (NASCIMENTO *et al.*, 2006; MAINARDI *et al.*, 2006; MOTA *et al.*, 2002). Apesar de poder parecer inusitada, a mesma relação entre alteração da percepção de etileno e

uma via metabólica inerente ao amadurecimento também foi vista em tomates (Purgatto *et al.*, 2012 dados não publicados). Junto com este trabalho, as evidências apontam como factível a hipótese de que a mudança na sinalização de etileno seja, ao menos em parte, responsável por alterar o padrão de degradação do amido.

No referido trabalho, os tomates (*Solanum lycopersicum* cv. VNFT Cherry) pós-colheita tratados com ácido indol-3-acético apresentaram alteração na via de síntese de carotenóides (PURGATTO *et al.*, 2012 - dados não publicados). Nestes frutos, LeETR1, LeETR4 e Nr tiveram a transcrição reprimida. Pelo menos parcialmente a alteração da via dos carotenóides pode ter sido decorrente da diferente sinalização promovida pelo conjunto alterado de receptores de etileno. A figura 16 ilustra o comprometimento no desenvolvimento da cor dos frutos tratados com AIA.

Figura 16: Tomates da cultivar VNFT Cherry controle e tratados com ácido indol-3-acético (AIA) 100uM durante o amadurecimento. Conforme se observa, os frutos submetidos à infiltração com o AIA tiveram comprometimento da síntese de licopeno. (Foto cedida por Purgatto, 2012).

Procurando isolar os efeitos da auxina sobre receptores e enzimas, um experimento com anti-auxina foi proposto e executado neste trabalho. Pretendia-se ajudar a esclarecer se a influência de AIA sobre o metabolismo de amido se dá por um e/ou outro motivo (sobre os receptores de etileno e/ou diretamente sobre as enzimas). Uma vez que não foi alcançado o objetivo esperado nas amostragens (seção 4.1) por conta da ineficácia dos compostos (ácido clorofenóxi-isobutírico e ácido 3-(2-furil)-acrílico) nas bananas deste experimento, não foram obtidas evidências que permitam o descarte de uma das hipóteses.

O perfil diminuído da transcrição do gene de β -amilase pode ser uma das consequências da repressão de ETR1. Não se deve descartar, no entanto, a influência direta do AIA sobre a transcrição da β -amilase, dado que em seu promotor foi detectada uma sequência responsiva a auxinas (ASTORINO FILHO, 2008). É provável que as diferenças observadas

nos níveis de transcritos de DPE2 também sejam reguladas por estes dois caminhos (via alteração direta de auxina e via alteração da sinalização de etileno).

Segundo Binder *et al.*, 2012 “Todas as isoformas de receptores contribuem para sinalização de etileno e têm funções em grande parte sobrepostas. Entretanto, também é claro que os receptores não são perfeitamente redundantes em seus papéis ou importância”.

Indicações de que determinadas isoformas podem ser mais importantes na sinalização de etileno já é reconhecido pela literatura. Zhao *et al.*, 2002 e Wang *et al.*, 2003, mostraram que mutantes *etr1;ers1*, ambos pertencentes a subfamiliar1 em *Arabidopsis*, possuem um fenótipo de resposta constitutiva mais severo do que outros duplos mutantes.

Outros trabalhos mostraram que uma isoforma específica de receptor pode ter um papel não substituível por outras. Por exemplo os trabalhos de Binder *et al.*, 2006 e Kim *et al.*, 2011 mostraram que o ETR1 tem função fundamental em garantir o movimento de natação mediado pela presença de etileno em *Arabidopsis* e que as demais isoformas não promovem o mesmo efeito, sendo este exclusivamente relacionado ao ETR1.

Os estudos de Tieman *et al.*, 2000 e Kevany *et al.*, 2007 mostraram que tomates com LeETR4 e LeETR6 *antisense* amadureceram precocemente. Entretanto frutos com Nr (subfamília I) em abundância e níveis de LeETR4 (subfamília II) suprimidos apresentaram amadurecimento normal, sugerindo capacidade de redundância funcional entre estes receptores e subfamílias neste vegetal.

Também em diferentes frutos diferentes receptores podem estar envolvidos com a resposta frente a um mesmo estímulo. Por exemplo a presença de altos níveis de AIA em pêssago reprime ETR2 (TRAINOTTI *et al.*, 2007), enquanto que a presença de NAA em córtex de maçã estimula ERS1 (LI E YUAN, 2008); AIA em sementes estioladas de arroz promove aumento de ETR2 (YAU *et al.*, 2004) e AIA em raiz de alface promove incremento nos níveis de ERS1 (TAKAHASHI *et al.*, 2010).

Estes exemplos sugerem que os receptores possuem tanto funções distintas uns dos outros como também sobrepostas, a depender do vegetal e tecido em que se encontram. Além disso, receptores das diferentes subfamílias podem desempenhar papéis mais ou menos predominantes em uma ou outra espécie vegetal (BINDER *et al.*, 2012).

De acordo com o exposto, é importante ressaltar que embora os resultados deste trabalho indiquem a possibilidade do controle da expressão dos receptores de etileno serem exercidos também pelo AIA, estes devem ser avaliados a luz dos limites do modelo utilizado. A estratégia adotada em tomates intactos, conforme citada no texto, não são factíveis de

serem realizados em frutos de banana inteiros, mas outras estratégias são fundamentais para se avaliar se a resposta fisiológica observada nas fatias se mantém nos frutos intactos.

4.1 AMOSTRAGEM COM INFILTRAÇÃO DE ACC ASSOCIADO À AIA EM FATIAS DE BANANA cv NANICÃO

De maneira complementar, para se avaliar os efeitos metabólicos do AIA, sobretudo sobre a via de degradação de amido em bananas, foram propostas amostragens utilizando-se antagonistas de AIA, como o ácido clorofenóxi-isobutírico (PCIB) e o ácido 3-(2-furil)-acrílico.

Em ambos os ensaios, os resultados observados não foram adequados aos objetivos pretendidos, pelo menos no que diz respeito ao metabolismo de degradação de amido e a dose de hormônio empregada nos experimentos.

Na amostragem realizada com o PCIB, era esperado que o efeito encontrado fosse oposto ao promovido por AIA, uma vez que o PCIB se liga ao receptor TIR1 e bloqueia os efeitos promovidos pelo hormônio. Particularmente em relação ao metabolismo amido-açúcares solúveis (Figura 17), o PCIB apresentou efeito similar ao AIA, atrasando em dois dias o início da fase de declínio rápido dos níveis de amido quando comparados ao grupo controle

Figura 17: Efeitos da infiltração de AIA 100uM e PCIB 100uM sobre a degradação de amido e síntese de glicose, frutose e sacarose em fatias de banana cv Nanicão. Pode ser observado que AIA atrasa a degradação de amido, o que se reflete em menor acúmulo de açúcares solúveis pelo fruto. O antagonista de auxina, PCIB, não promoveu efeitos opostos ao da auxina; nestes frutos também a degradação de amido foi atrasada e houve intensa inibição do acúmulo dos açúcares solúveis.

Os resultados encontrados nos frutos tratados com o PCIB indicam, no entanto, um comprometimento importante da síntese de açúcares solúveis, principalmente de sacarose. O composto parece exercer influência específica sobre esta via metabólica, e os resultados abrem novo campo para estudos sobre a influência do PCIB na síntese de açúcares solúveis em bananas.

Em nova tentativa de encontrar uma antiauxina adequada, testou-se a infiltração com o ácido 3-(2-furil)-acrílico 200uM. Inesperadamente, as fatias apresentaram grande susceptibilidade ao ataque por fungos já nos primeiros dias de acompanhamento, o que tornou inviável a continuação do experimento.

Frente aos resultados encontrados, optou-se por uma nova abordagem, a fim de reforçar os resultados acerca do envolvimento do AIA na modificação da percepção ao etileno. Propôs-se utilizar uma combinação de AIA (ácido indol-3-acético) e ácido 1-carboxílico 1-amino ciclopropano (ACC), precursor imediato da síntese do etileno, em um novo experimento de infiltração.

Esta nova amostragem se baseou em um trabalho de Purgatto et al. (dados não publicados). Os autores verificaram que a infiltração de AIA, mesmo na presença de altas doses de ACC, foi capaz de comprometer o desenvolvimento da cor de frutos de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom), o que aponta que a ação de AIA é crítica ao amadurecimento. A figura 18 mostra a evolução do amadurecimento de tomates tratados concomitantemente com altas doses de AIA e ACC.

Figura 18: Efeito da aplicação combinada de ACC 100uM e AIA 100uM em tomates. As imagens indicam menor alteração na coloração dos frutos tratados com os hormônios, em comparação ao controle, mostrando que, mesmo com o precursor do etileno em altas doses, o AIA é capaz de retardar ao menos uma via do amadurecimento destes frutos.

Observa-se pela figura 19, que o grupo tratado somente com ACC teve o aumento de etileno em níveis climatéricos já no DPI6, anterior ao controle, similar ao que acontece com frutos de banana inteiros tratados com etileno exógeno (Nascimento *et al.*,2006). Já o grupo tratado com AIA + ACC teve o aumento de etileno climatérico em tempo intermediário entre o grupo tratado com ACC e o controle, o que mostra que o AIA foi capaz de atrasar o climatério em frutos tratados com ACC+ AIA.

Com relação ao perfil de degradação de amido, fica claro que o grupo tratado somente com ACC degrada o polissacarídeo mais rapidamente que os demais e, novamente, o perfil de degradação do grupo tratado com AIA + ACC foi intermediário entre o grupo tratado somente com ACC e o controle. O AIA, além de contrapor o efeito do ACC no que tange a síntese de etileno climatérico, também reduziu a velocidade com que o amido é degradado quando na presença do precursor de etileno.

Figura 19: Perfil de produção de etileno e de degradação de amido dos frutos controle, tratados com solução contendo ACC 100 μM e tratados com solução contendo ACC 100 μM e AIA 100 μM . As barras verticais representam o desvio padrão das análises (n=3).

Os resultados parecem reforçar a ação conjunta entre etileno e auxina no metabolismo de amido e poderão direcionar o desenvolvimento de outros estudos, que visem avaliar a influência de AIA sobre a percepção do etileno em frutos. Embora esta relação já venha sendo apontada há anos, é importante ressaltar novamente que a ausência de modelos de estudo que permitam manipular os níveis de AIA nos tecidos de frutos inteiros ainda é uma barreira a ser superada para o maior aprofundamento do papel deste hormônio no amadurecimento. O uso deste modelo de infiltração em fatias de bananas, por enquanto, tem apresentado resultados significativos e apresenta um bom potencial para exploração, não apenas para o AIA, como também para outros hormônios vegetais.

5 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho reforçam achados anteriores e indicam que a alteração da percepção ao etileno pode ser um dos mecanismos pelos quais o AIA promove as perturbações no metabolismo relacionado à degradação de amido em bananas.

O efeito parece ser decorrente, ao menos em parte, da alteração da expressão gênica dos receptores de etileno, primeiro patamar da via de sinalização do hormônio. Sendo assim, vias metabólicas comandadas pelo etileno podem sofrer modificações em seu funcionamento, como mostraram os resultados de acúmulo dos transcritos dos genes e a atividade das enzimas β -amilase e DPE2.

A respeito de β -amilase, parece muito clara e direta a influência de AIA já durante a transcrição de seus genes, se refletindo na atividade da enzima. Em relação a DPE2, mecanismos pós transcrição também parecem estar envolvidos na regulação da enzima, uma vez que o perfil de transcritos e atividade mostram-se pouco correlacionados, tanto nos grupos controle como tratados com AIA.

O presente trabalho trouxe informações importantes sobre o *crosstalk* entre etileno e auxina em relação ao metabolismo de amido em bananas. No entanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novos estudos para maior elucidação da influência de AIA sobre a percepção de etileno pelo fruto, sobre a via de degradação de amido também em outros frutos e, principalmente, sobre os demais pontos da via de sinalização de etileno.

6 REFERÊNCIAS

- ADÃO, R.C.; GLORIA, B.A. Bioactive amines and carbohydrate changes during ripening of 'prata' banana (*Musa acuminata* x *M. Balbisiana*). **Food chemistry**, v. 90, n. 4, p. 705-711, may, 2004.
- ADAMS, D.O.; YANG, S.F. Ethylene biosynthesis: identification of 1- aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 76, p. 170-174, 1979.
- ADAMS-PHILLIPS, L.; BARRY, C.; KANNAN, P.; LECLERCQ, J.; BOUZAYEN, M.; GIOVANNONI, J. Evidence that CTR1-mediated ethylene signal transduction in tomato is encoded by a multigene family whose members display distinct regulatory features. **Plant Molecular Biology**, v. 54, p. 387-404, 2004.
- ARÊAS, J.A.G.; LAJOLO, F.M. Determinação enzimática específica de amido, glicose, frutose e sacarose em bananas pré-climatéricas e climatéricas. **Anais de Farmácia e Química de São Paulo**, v. 20, p. 307-318, 1980.
- ASTORINO FILHO, R. Caracterização funcional do gene maBMY que codifica para uma beta-amilase endereçada a plastídeos e expressa durante o amadurecimento da banana. 2008. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.
- BALMER, Y., VENSEL, W.H., CAI, N., MANIERI, W., Schurmann, P., Hurkman, W.J., Buchanan, B.B. A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental process in amyloplasts. **Proc Natl Acad Sci**, v. 103, p. 2988 – 2993, 2006.
- BANDURSKI ,R.S., COHEN, J.D., SLOVIN, J.P., REINECKE, D.M. Auxin biosynthesis and metabolism. In: Davies P, editor. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht, **The Netherlands: Kluwer Academic Publishers**, pp. 39-65, 1995.
- BERGMEYER, H.U. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press, 2 ed., 1974.
- BERNARDES SILVA, A. P. F.; NASCIMENTO, J.R.O.; LAJOLO, F.M.; CORDENUNSI, B.R. Starch mobilization and sucrose accumulation in the pulp of keitt mangoes during postharvest ripening. **Journal of Food Biochemistry**, v.32, p.384-395, Jun, 2008.
- BINDER, B.M.; O'MALLEY, R.C.; WANG, W.; ZUTZ, T.C.; BLEECKER, A.B. Ethylene stimulates mutations that are dependent on the ETR1 receptor. **Plant Physiology**, v. 142, p.1690-1700, 2006.
- BINDER, B.M. The ethylene receptors: Complex perception for a simple gas. **Plant Science**, v. 175, p. 8-17, 2008.
- BINDER, B.M.; CHANG, C.; SCHALLER, G.E. Perception of ethylene by plants – ethylene receptors. **Annual Plant Reviews**, v. 44, p. 117-145, 2012.

BISSON, M. M. A.; BLECKMANN, A.; ALLEKOTTE, S.; GROTH, G. EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1. **Biochem. J.**, v.424, p1-6, 2009.

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**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, may, 1976.

BUTA J.G.; SPAULDING D.W. Changes in indole-3-acetic acid and abscisic acid levels during tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit development and ripening. **J. Plant Growth Regul.**, v. 13, p.163–166, 1994.

CANCEL, J. D.; LARSEN, P. B. Loss-of-Function Mutations in the Ethylene Receptor ETR1 Cause Enhanced Sensitivity and Exaggerated Response to Ethylene in Arabidopsis. Loss-of-Function Mutations in the Ethylene Receptor ETR1 Cause Enhanced Sensitivity and Exaggerated Response to Ethylene in Arabidopsis. **Plant Physiol**, v. 129, p. 1557-1567, aug, 2002.

CARA, B.; GIOVANNONI, J.J. Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. **Plant Science**, v.175, p.106-113, jul-ago, 2008.

CHANG, C.; KWOK, S.F.; BLEECKER, A.B.; MEYEROWITZ, E.M. Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. **Science**, v. 262, p. 539-544, oct, 1993.

CHAO, Q.; ROTHENBERG, M.; SOLANO, R.; ROMAN, G.; TERZAGHI, W.; ECKER, J.R. Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. **Cell**, v. 89, p.1133– 1144, 1997.

CHEN, Y.; RANDLETT, M. D.; FINDELL, J. L.; SCHALLER, G. E. Localization of the Ethylene Receptor ETR1 to the Endoplasmic Reticulum of Arabidopsis. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n.22, p. 19861-19866, 2002.

CHIA, T.; THORNEYCROFT, D.; CHAPPLE, A.; MESSERLI, G.; CHEN, J.; ZEEMAN, S.C.; SAMUEL C.; SMITH, S.M., SMITH, A. A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in Arabidopsis leaves at night. **The Plant Journal**, v. 37, n.6, p. 853–863, march, 2004.

CHIEBAO, H.P. Expressão gênica dos receptores de etileno (ETR1, ERS2, ERS3 e CTR1) no desenvolvimento da banana (*Musa acuminata* cv. Nanicão) e sua correlação com variações hormonais e atributos de qualidade do fruto. 2011. Exame de Qualificação (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.

CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. **J. Agric. Food Chem.**, v.43, n.2, p. 347–351, 1995.

DAVIES, P.J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: *Plant Hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 1995, v.2, p.1-12.

DEIKMANN, W.; VENIS, M.A.; ROBINSON, D.G. Auxins induce clustering of the auxin-binding protein at the surface of maize coleoptile protoplasts. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.92, p. 3425–3429, 1995.

DHINDSA, R. S. Hormonal regulation of cotton ovule and fiber growth: effects of bromodeoxyuridine, amo-1618 and p-chlorophenoxyisobutyric acid. **Planta**, v. 141, p.269–272, 1978.

EL-SHARKAWY, I.; SHERIF, S.; MILA, I.; BOUZAYEN, M.; JAYASANKAR, S. Molecular characterization of seven genes encoding ethylene responsive transcriptional factors during plum fruit development and ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 907–922, 2009.

FABI, J.P.; CORDENUNSI, B.R.; BARRETO, G.P.M.; MERCADANTE, A.Z., LAJOLO F.M.; NASCIMENTO J.R.O. Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP). **J. Agric. Food Chem.**, v.55, p. 6118–6123, 2007.

FETTKE, J.; HEJAZI, M.; SMIRNOVA, J.; HÖCHEL, E.; STAGE, M.; STEUP, M. Eukaryotic starch degradation: integration of plastidial and cytosolic pathways. **J. Exp. Bot.**, v.60, p. 2907–2922, 2009.

FETTKE, J.; NUNES-NESE, A.; FERNIE, R.A.; STEUP, M. Identification of a novel heteroglycan-interacting protein, HIP 1.3, from *Arabidopsis thaliana*. **J Plant Physiol**, Nov 16, 2010.

FULTON, D. C.; STETTLER, M.; METTLER, T.; VAUGHAN, C. K.; LI, J.; FRANCISCO, P. , GIL, M.; REINHOLD, H.; EICKE, S.; MESSERLI, G.; DORKEN, G., HALLIDAY, K.; SMITH, A.M.; SMITH, S. M.; ZEEMAN, S. C. B-AMYLASE4, a Noncatalytic Protein Required for Starch Breakdown, Acts Upstream of Three Active β -Amylases in *Arabidopsis* Chloroplasts. **The Plant Cell**, v. 20, p.1040–1058, 2008.

FURUKAWA, M., ZHANG, Y., MCCARVILLE, J., OHTA, T., AND XIONG, Y. The CUL1 C-terminal sequence and ROC1 are required for efficient nuclear accumulation, NEDD8 modification, and ubiquitin ligase activity of CUL1. **Mol. Cell. Biol.**, v.20, p.8185–8197, 2000.

FRENKEL, C.; DYCK, R. Auxin inhibition of ripenin in barlett pears. **Plant Physiol**, v.51, p. 6–9, 1973.

GAMBLE, R.L.; QU, X.; SCHALLER, G.E. Mutational analysis of the ethylene receptor ETR1: role of the histidine kinase domain in dominant ethylene insensitivity. **Plant Physiol**, v. 128, p. 1428–1438, 2002.

GAO, Z.; CHEN, Y.F.; RANDLETT, M.D.; ZHAO, X.C.; FINDELL, J.L.; KIEBER, J.J.; SCHALLER, G.E. Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. **J. Biol. Chem**, v. 278, p. 34725–34732, 2003.

GAO, Z.; WEN, C.; BINDER, B. M.; CHEN, Y.; CHANG, J.; CHIANG, Y.; KERRIS III, R.J.; CHANG, C.; SCHALLER, G.E. Heteromeric interactions among ethylenereceptors mediate signaling in Arabidopsis. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 23801–23810, 2008.

GARCIA, E.; LAJOLO, F. M. Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidase behavior. **J. Food Sci.**, v.53, n.41, p. 1181-1186, 1988.

GIOVANNONI, J.J. Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. **The Plant Cell**, v. 16, p.S170-S180, 2004.

GOFFI, S. A.; KLEE, H.J. Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value? **Science**, v. 311, feb., 2006.

GRAY, W.M., KEPINSKI, S., ROUSE, D., LEYSER, O., ESTELLE, M. Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. **Nature**, v. 414, p. 271–76, 2001.

GUO, H.; ECKER, J. R. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCFEBF1/EBF2 dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. **Cell**, v. 115, n.6, p. 667-677, dec, 2003.

GUO, H.; ECKER, J.R. The ethylene signaling pathway: New insights. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 7, p. 40–49, 2004.

HAO D., OHME-TAKAGI M., SARAI A. Unique mode of GCC box recognition by the dna-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. **J Biol Chem**, v. 273, p. 26857–26861, 1998.

HARMER, S. L.; HOGENESCH, J. B.; STRAUME, M.; HANG, H.; HAN, B.; ZHU, T., WANG, X.; KREPS, J.A.; KAY, S.A. Orchestrated Transcription of Key Pathways in Arabidopsis by the Circadian Clock. **Science**, v. 290, n.5499, dec, 2000.

HE L.H., CHEN J.Y., YU W.M., WANG, Y., LU W.J. Cloning and Expression Analysis of *Ethylene Receptor* in Harvested *Banana* Fruit. **Scientia Agricultura Sinica**, n.4, p. 1359-1364, 2009.

HONG, Z.; CHEN, Y.F.; LI, X.P.; LI, J.; HAN, D.F.; CHEN, W.X. Determination of volatiles in harvested banana fruit by HS-SPME and GC-MS. **Acta Horticulturae Sinica**, v.2, 2007.

HUA, J.; CHANG, C.; SUN, Q.; MEYEROWITZ, E. Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene. **Science**, v. 269, p. 1712–1714, 1995.

HUA J.; MEYEROWITZ, E.M. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in Arabidopsis thaliana. **Cell**, v. 94, p. 261–271, 1998.

JONES A. M., HERMAN E. KDEL-Containing Auxin-Binding Protein Is Secreted to the Plasma Membrane and Cell Wall. **Plant Physiol.**, v.101, p. 595–606, 1993.

JOHKAN, M.; CHIBA, T., MITSUKURI, K.; YAMASAKI, S.; TANAKA, H.; MISHIBA, K.; MORIKAWA, T.; ODA, M.; YAMAMOTO, C.; OHKAWA, H. Seed production enhanced by antiauxin in the PAT-2 parthenocarpic tomato mutant. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 135, p. 3-8, 2010.

JÖNSSON, A. Chemical structure and growth activity of auxin and antiauxins. **Encyclopedia of Plant Physiology**, Berlin, v. 14, p. 959–1006, 1961.

KAPLAN, F.; GUY, C.L. β -amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock in plant physiology. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1674–1684, 2004.

KEVANY, B.M.; TIEMAN, D.M.; TAYLOR, M.G.; CIN, V.D.; KLEE, H.J. Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. **The Plant Journal**, v.51, p. 458–467, 2007.

KENDRICK, M. D.; CHANG, C. Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, p. 479–485, 2008.

KIEBER, J. J.; ROTHENBERG, M.; ROMAN, G.; FELDMANN, K. A.; ECKER, J. R. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the Raf family of protein kinases. **Cell**, v.72, p. 427–441, 1993.

KIM, H.; HELMBRECHT, E.E; STALANS, M.B.; SCHMITT, C., PATEL, N.; WEN, C.K.; WANG, W., BINDER, B.M. Ethylene receptor ETR1 domain requirements for ethylene responses in Arabidopsis seedlings. **Plant Physiology**, v.156, n.1, p. 417–429, 2011.

KLEE, H. J. Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377 p. 2057–2063, oct, 2002.

KLEE H.J. Ethylene signal transduction moving beyond Arabidopsis. **Plant Physiol**, v. 135, p. 660–667, 2004.

LAO, N.T.; SCHONEVELD, O.; MOULD, R.M.; HIBBERD, J.M.; GRAY, J.C.; KAVANAGH, T.A. An Arabidopsis gene encoding a chloroplast-targeted β -amylase. **Plant Journal**, v. 20, p. 519–527, 1999.

LI, J.; YUAN, R. NAA and Ethylene Regulate Expression of Genes Related to Ethylene Biosynthesis, Perception, and Cell Wall Degradation During Fruit Abscission and Ripening in ‘Delicious’ Apples. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.27, n.3, p. 283–295, 2008.

LLOYD, J.R.; KOSSMANN, J.; RITTE, G. Leaf starch degradation comes out of the shadows. **Trends in Plant Science**, v.10, n.3, mar., 2005.

LU, Y.; SHARKEY, T. D. The importance of maltose in transitory starch breakdown. **Plant Cell Environ.**, v. 29, n. 3, p. 353–366, mar., 2006

LUDWIG-MÜLLER, J., GEORGIEV, M., BLEY, T. Metabolite and hormonal status of hairy root cultures of Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) in flasks and in a bubble column bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 15–23, 2008.

MA, B.; CUI, M.L.; SUN, H.J.; TAKADA, K.; Mori, H.; KAMADA, H.; EZURA, H. Subcellular localization and membrane topology of the melon ethylene receptor CmERS1. **Plant Physiology**, v. 141, p. 587–597, jun, 2006.

MAEO, K.; TOMIYA, T.; HAYASHI, K.; AKAIKE, M.; MORIKAMI, A.; ISHIGURO, S.; NAKAMURA, K. Sugar-responsible elements in the promoter of a gene for beta-amylase of sweet potato. **Plant Mol. Biol.**, v. 46, p. 627–637, 2001.

MAINARDI, J.A.; PURGATTO, E.; VIEIRA, A.; BASTOS, W. A.; CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J.R.O.; LAJOLO, F.M. Effects of ethylene and 1- methylecyclopropene (1-MCP) on gene expression and activity profile of -1,4-glucanphosphorylase during banana ripening. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, n.19, p. 7294- 7299, 2006.

MARTIN, C.; SMITH, A.M. Starch biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 971-985, july, 1995.

MOTA, R.V.; CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.O.; PURGATTO, E.; ROSSETO, M.R.M.; LAJOLO, F.M. Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening. **Planta**, v.216, p. 325–333, 2002.

NASCIMENTO, J.R.O.; VIEIRA JR, A.; BASSINELLO, P.Z.; CORDENUNSI, B.R.; MAINARDI, J.A.; PURGATTO, E.; LAJOLO, F.M. β -amylase expression and starch degradation during banana ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 40, p. 41–47, 2006.

NELJUBOW, D. Ueber die Horizontale Nutation der Stengel von Pisun Sativun und Einiger Anderen Pflanzen. **Pflanzen Beith. Bot. Zentralb.**, v. 10, p. 128-139, 1901.

NITSCH, J.P. Free auxinas and free tryptophane in the strawberry. **Plant physiology**, .30, p33-39,1955.

O'MALLEY, R.C.; RODRIGUEZ, F.I.; ESCH, J.J.; BINDER, B.M.; O'DONNELL, P.; KLEE, H. J.; BLEECKER, A.B. Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from Arabidopsis and tomato. **Plant J**, v. 41, p. 651–659, 2005.

OUAKED, F.; ROZHON, W.; LECOURIEUX, D.; HIRT, H. A MAPK pathway mediates ethylene signaling. **EMBO J**. v. 22, p. 1282–1288, 2003.

PANG, J. H.; MAA, B.; SUNA, H.J.; ORTIZ, G. I.; IMANISHI, S.; SUGAYA, S.; GEMMA, H.; EZURA, H. Identification and characterization of ethylene receptorhomologs expressed during fruit development and ripening in persimmon (*Diospyros kaki* Thumb.). **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, p. 195–203, 2007.

PESIS, E. The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. **Postharvest Biology and Technology**, v. 37, p.1-19, 2005.

PURGATTO, E.; LAJOLO, F. M.; NASCIMENTO, J.R.O.; CORDENUNSI, B.R. Inhibition of β -amylase activity, starch degradation, and sucrose formation by indole-3- acetic acid during banana ripening. **Planta**, v.212, p. 823:828, 2001.

PURGATTO, E.; NASCIMENTO, J.R.O.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B.R. Onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. **J. Plant physiol.**, v.159, p. 1105-1111, 2002.

QUINT, M., GRAY, W.M. Auxin signaling. **Curr Opin Plant Biol**, v. 9, p. 448–453, 2006.

RESNICK J.S., WEN C.K., SHOCKEY J.A., CHANG C. Reversion-to-ethylene sensitivity1, a conserved gene that regulates ethylene receptor function in Arabidopsis. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v.103, n.2, p. 7917-7922, may, 2006.

REIDEL, E. J., R. TURGEON AND L. CHENG. A maltose transporter from apple is expressed in source and sink tissues and complements the Arabidopsis maltose export defective mutant. **Plant and Cell Physiology**, v. 49, p. 1607-1613, 2008.

ROSSETTO, M.R.M.; LAJOLO, F.M.; CORDENUNSI, B.R. Influência do ácido giberélico na degradação do amido durante o amadurecimento da banana. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.24, n.1, p. 076-081, jan.-mar., 2004.

RODRIGUEZ, F.I.; ESCH, J.J.; HALL, A.E.; BINDER, B.M.; SCHALLER, G.E.; BLEECKER, A.B. A copper cofactor for the ethylene receptor *etr1* from Arabidopsis, **Science**, v. 283, p. 996–998, 1999.

SAKAI, H.; HUA, J.; HONG, Q.; CHEN, G.; CHANG, C.; MEDRANO, L.J.; BLEECKER, A. B.; MEYEROWITZ, E.M. *ETR2* is an *ETR1*-LIKE gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, v. 95, n.10 p. 5812– 5817, may, 1998.

SCHALLER, G.E.; LADD, A.N.; LANAHAHAN, M.B.; SPANBAUER, J.M.; BLEECKER A.B. The ethylene response mediator *ETR1* from Arabidopsis forms a disulfide- linked dimer. **J. Biol. Chem.**, v.270, p. 12526–12530, 1995.

SEKI, M. ; NARUSAKA, M.; ABE, H.; KASUGA, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K; CARNINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. **Plant Cell**, v. 13, p. 61–72, 2001.

SMITH, A.M.; ZEEMAN, S. C.; SMITH, S.M. Starch Degradation. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.56, p. 73–98, 2005.

SOLANO, R.; STEPANOVA, A.; CHAO, Q.; ECKER, J.R. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by *ETHYLENE-INSENSITIVE3* and *ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1*. **Genes & Development** , v.12, p. 3703–3714,1998.

SPARLA, F., COSTA, A., LO, SCHIAVO F., PUPILLO, P., TROST, P. Redox regulation of a novel plastid-targeted α -amylase of Arabidopsis thaliana. **Plant Physiology**, v. 141, p. 840–850, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal** [Plant physiology], 3. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2004, 720p.

TAKAHASHI, H.; NAKAMURA, A.; HARIGAYA, W.; FUJIGASAKI, R.; IWASA, T.; INOUE, Y. Increased expression of ethylene receptor genes during low pH-induced root hair formation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings: direct and indirect induction by ethylene and auxin, respectively. **Plant Root**, v. 4, p.53-64, 2010.

TETLOW, I.J.; MORELL, M.K.; EMES, M.J. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 406, p. 2131–2145, oct, 2004.

TIAN, H.; KLÄMBT, D.; JONES, A.M. AUXIN-BINDING PROTEIN 1 does not bind auxin within the endoplasmic reticulum despite this being the predominant subcellular location for this hormone receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 26962-26969, nov., 1995.

TIEMAN D.V.; TAYLOR ,M.G.; CIARDI ,J.A.; KLEE, H.J. The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, v. 97, p. 5663–5668, 2000.

TIWARI, S.B., HAGEN, G., GUILFOYLE, T. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. **Plant Cell**, v. 15, p.533–43, 2003.

TRAINOTTI, L.; TADIELLO, A.; CASADORO, G. The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 12, p. 3299–3308, 2007.

TROMAS, A; PERROT-RECHENMANN,C. Progrès récents dans la biologie de l’auxine. **Comptes Rendus Biologies**, v.333, n. 4, p. 297–306, apr 2010.

VAN DAMME, E.J.M.; HU, J.; BARRE, A.; HAUSE, B.; WANG, W. G.; HALL, A.; O'MALLEY, R.; BLEECKER, A.B. Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis is not required for signal transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 100, p. 352–357, 2003.

VIEIRA JR, A. Alfa e Beta-amilase no metabolismo do amido durante o amadurecimento da banana: clonagem, expressão e caracterização molecular. 2006. 91f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

VENDRELL, M. Dual effect of 2, 4-D on ethylene production and ripening of tomato fruit tissue. **Physiologia Plantarum**, v.64, n.4, p. 559–563, Aug, 1985.

ZIEGLER, P.; BECK, E. Exoamylase activity in vacuoles isolated from pea and wheat leaf protoplast. **Plant Physiol.**, v. 82, p.1119–1121, 1986.

ZHANG, Y.; CHEN, K.S.; ZHANG, S.L.; WANG, J.H. Sugar metabolism and its regulation in postharvest ripening kiwifruit. **Plant Physiol. Mol. Biol.**, v. 30, n.3, p. 23-26, jun, 2004.

ZHAO, Y.; CHRISTENSEN, S.K.; FANKHAUSER, C.; CASHMAN, J.R.; COHEN, J.D.; WEIGEL, D.; CHORY, J. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. **Science**, v. 291, p. 306–309, 2001.

ZHAO, Y.C.; HASENSTEIN, K.H. Physiological interactions of antiauxins with auxin in roots. **J. Plant Physiol.**, v.167, n.11, p. 879-884, jul, 2010.

ZHU, H.L.; ZHU, B.Z.; SHAO, Y.; WANG, X.G.; LIN, X.J.; XIE, Y.H.; LI, Y.C.; GAO, H.Y.; LUO, Y.B. Tomato fruit development and ripening are altered by the silencing of LeEIN2 gene. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.48, n.12, p. 1478–1485, 2006.

WANG, W.; HALL, A. E.; O'MALLEY, R.; BLEECKER, A.B. Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis is not required for signal transmission. **PNAS**, v.100, n.1, jan, 2003.

ZHANG, D.P.; WANG, Y.Z. Post-translational inhibitory regulation of acid invertase induced by fructose and glucose in developing apple fruit. **Sci China (Ser C)**, v. 45, p. 309–321, 2002.

ZHAO, X.C., QU, X., MATHEWS, D.E., SCHALLER, G.E. Effect of ethylene pathway mutations upon expression of the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1983–1991, 2002.

WEIJERS, D.; JÜRGENS, G. Funneling auxin action: specificity in signal transduction. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p. 687–693, 2004.

YAMAMOTO, Y., KAMIYA, N., MORINAKA, Y., MATSUOKA, M., SAZUKA, T. Auxin biosynthesis by the YUCCA genes in rice. **Plant Physiol** 143: 1362–1371.(2007).

YAN, S.C., CHEN, J.Y., YU, W.M., KUANG, J.F., CHEN, W.X., LI, X.P., LU, W.J. Expression of genes associated with ethylene-signalling pathway in harvested banana fruit in response to temperature and 1-MCP treatment. **J Sci Food Agric.**, v.91, n.4, p.650-657, 2011.

YANG, Y.; HAMMES, U. Z.; TAYLOR, C.G.; SCHACHTMAN, D.P.; NIELSEN, E. High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. **Curr. Biol.**, v. 16, p. 1123–1127, 2006.

YANG, F.A. S.; HOFFMAN, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Ann. Rev. Plant physiol.**, v.35, p. 155-189, 1984.

YANG, Y.; STEUP, M. Polysaccharide Fraction from Higher Plants which Strongly Interacts with the Cytosolic Phosphorylase Isozyme 1. Isolation and Characterization. **Plant Physiol.**, v.94, p. 960-969, 1990.

YAU, C.P.; WANG, L.; YU, M.; ZEE, S.Y.; YIP, W. K. Differential expression of three genes encoding an ethylene receptor in rice during development, and in response to indole-3-acetic acid and silver ions. **J. Exp. Bot.**, v.55, n.397, p. 547-556, 2004.

YIN, X.; CHEN, K.; ALLAN, A.C.; WU, R.; ZHANG, B.; LALLU, N.; FERGUSON, I.B. Ethylene-induced modulation of genes associated with the ethylene signalling pathway in ripening kiwifruit. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 8, p. 2097–2108, 2008.

YOO, S.; CHO, Y.; TENA, G.; XIONG, Y.; SHEEN, J: Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C₂H₄ signaling. **Nature**, v. 451, p. 789-795, 2008.