

**Caracterização do cDNA da NAD-MDH Citosólica
e da H⁺ ATPase Vacuolar no Amadurecimento
da Anona (*Annona cherimola* Mill)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

José Roberto Câmara Aguiar
MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

Dezembro | 2011

UMa

J Car

**Caracterização do cDNA da NAD-MDH Citosólica
e da H⁺ ATPase Vacuolar no Amadurecimento
da Anona (*Annona cherimola* Mill)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

José Roberto Câmara Aguiar

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTAÇÃO

Maria Manuela Câmara de Gouveia

Resumo

A *Annona cherimola* é um fruto exótico, com um sabor agradável. Este fruto tem um elevado potencial comercial, mas apresenta um tempo médio de vida curto devido ao seu rápido amadurecimento. Por esta razão é necessário conhecer melhor o processo de amadurecimento deste fruto. Na Região Autónoma da Madeira a cultura da anoneira é muito importante em termos comerciais.

O processo de amadurecimento leva a diversas modificações bioquímicas e fisiológicas. Existem várias enzimas e substâncias que integram este processo. Neste trabalho iremos estudar os genes das enzimas malato desidrogenase e H^+ ATPase vacuolar que estão envolvidos no processo de amadurecimento dos frutos. Utilizando as técnicas de RACE e sequenciação foi possível determinar a sequência nucleotídica do cDNA destes genes.

O cDNA da malato desidrogenase é composto por 1364 nucleótidos, contendo uma zona 5' UTR com 84 nucleótidos, uma zona 3' UTR com 284 nucleótidos e um sinal de poliadenilação com a sequência AATAAA. A ORF apresenta 996 nucleótidos, codificando uma proteína com 332 aminoácidos.

Para a H^+ ATPase vacuolar foi amplificado o cDNA da subunidade C do domínio V_1 . Esta apresenta 799 nucleótidos, dos quais 36 são da 5' UTR, 266 da 3' UTR e 498 da ORF. A ORF codifica uma proteína com 166 aminoácidos.

Palavras-chaves: *Annona cherimola* Mill., Amadurecimento dos frutos, cDNA, Malato desidrogenase, H^+ ATPase vacuolar, RACE.

Abstract

The *Annona cherimola* is an exotic fruit, which has a very pleasant taste. This fruit has a high commercial potential, but due to its rapid ripening it presents a short lifespan. For this reason, it is necessary to understand the ripening process of this fruit. In Madeira, the *Annona cherimola* culture is very important in commercial terms.

The ripening process leads to several biochemical and physiological changes. There are several enzymes and substances that are a part of this process. In this work we will study the enzymes genes malate dehydrogenase e vacuolar H⁺ ATPase that are involved in the fruit ripening process. Using the RACE techniques and sequencing we were able to determine the nucleotide sequence of these genes.

The cDNA of malate dehydrogenase is composed by 1364 nucleotides, which have a 5' UTR with 84 nucleotides, a 3' UTR with 284 nucleotides. In the 3' UTR was found a polyadenylation signal (AATAAA). The ORF had 996 nucleotides encoding a protein with 332 amino acids.

It is important to stress out that the vacuolar H⁺ ATPase presents a structure with two domains and several sub-units. It was amplified the sub-unit C of the V₁ domain. The cDNA had 686 nucleotides, with a 5' UTR composed of 64 nucleotides, while 3' UTR had 266 nucleotides and the ORF ha a length of 356 nucleotides encoding a protein with 119 amino acids.

Keywords: *Annona cherimola* Mill., Fruit Ripening, cDNA, Malate, Vacuolar H⁺ ATPase, RACE.

Agradecimentos

O trabalho exposto neste manuscrito foi realizado sob a orientação da Professora Doutora Manuela Gouveia, na Universidade da Madeira.

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à minha família, aos meus pais, José e Teresa Aguiar e aos meus irmãos Nuno e David Aguiar por todo o apoio e incentivo que me ofereceram ao longo da realização deste trabalho.

Gostaria de expressar a minha gratidão à minha orientadora Professora Doutora Manuela Gouveia, pelo apoio e compreensão que me ofereceu.

Quero também, agradecer à Lucília Sousa e Margarida Pestana, pelo apoio que me prestaram especialmente durante a parte de clonagem dos fragmentos de DNA obtidos.

Aos meus amigos Alexandre Nunes, Nuno Nunes e Pedro Silva que me acompanharam durante todo este tempo e me incentivaram a continuar.

À Universidade da Madeira, especialmente ao Centro de Competências de Ciências da Vida e ao Laboratório de Genética Humana, por me autorizarem a utilizar alguns equipamentos necessários para a realização da parte experimental.

A todas as pessoas que de uma forma directa ou indirectamente me ajudaram a concretizar este trabalho.

Índice Geral

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Índice Geral.....	iv
Índice de Tabelas.....	vi
Índice de Figuras.....	vii
Lista de Abreviaturas.....	ix
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1. <i>Annona cherimola</i> Miller.....	5
2.2. <i>Annona cherimola</i> na Região Autónoma da Madeira.....	6
2.3. Amadurecimento dos frutos.....	7
2.4. Malato desidrogenase.....	12
2.5. H ⁺ ATPase vacuolar.....	14
2.6. Poliadenilação.....	17
3. Material e Métodos.....	18
3.1. Desenho dos primers.....	19
3.2. Extracção de RNA.....	19
3.3. Amplificação rápida das extremidades do cDNA.....	20
3.4. Electroforese em gel de agarose.....	26
3.5. Clonagem.....	26
3.6. Sequenciação.....	27
4. Resultados e Discussão.....	28
4.1. Optimização do RACE.....	29
4.2. Clonagem.....	31
4.3. Sequenciação.....	36
4.4.1. Análise da MDH.....	37
4.4.2. Análise da Vac H ⁺ ATPase.....	39

5. Conclusões.....	42
6. Referências Bibliográficas.....	44
Anexos.....	53

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 – Tamanho esperado para as extremidades amplificadas por RACE para a MDH e Vac H ⁺ ATPase.....	19
Tabela 3.2 – Primers específicos utilizados para o RACE da MDH e da Vac H ⁺ ATPase.....	22
Tabela 3.3 - Condições utilizadas no PCR para a primeira amplificação do MDH 5'.....	23
Tabela 3.4 - Condições utilizadas no PCR para a primeira amplificação do Vac 5'.	23
Tabela 3.5 - Condições utilizadas no PCR para a segunda amplificação do MDH 5'.	24
Tabela 3.6 - Condições utilizadas no PCR para a segunda amplificação do Vac 5'.	24
Tabela 3.7 - Condições utilizadas no PCR para a primeira amplificação do MDH 3'.	24
Tabela 3.8 - Condições utilizadas no PCR para a amplificação do Vac 3'.....	25
Tabela 3.9 - Condições utilizadas no PCR para a segunda amplificação na MDH 3'.	25
Tabela 3.10 - Condições utilizadas para o PCR de confirmação da clonagem.....	27
Tabela 4.1 – Temperaturas de fusão empíricas para os primers utilizados durante o RACE.	29

Índice de Figuras

Figura 2.1 – Esquema do gene da MDH para a maçã.....	14
Figura 2.2 – Representação esquemática da Vac H ⁺ ATPase.	16
Figura 3.1 – Representação esquemática da amplificação da extremidade 5', utilizando a técnica RACE.....	21
Figura 3.2 – Representação esquemática da amplificação da extremidade 3', utilizando a técnica RACE.....	22
Figura 4.1 – Amplificação da MDH 5' A- primeira amplificação, 1 – fragmento de 600 pb e o marcador de 100 pb. B - segunda amplificação, 1 - 500 pb e o marcador de 100 pb.....	30
Figura 4.2 – Amplificação da MDH 3' A- primeira amplificação, 1 – fragmento de 1000 pb e o marcador de 100 pb. B - segunda amplificação, 1 - fragmento de 800 pb e o marcador de 100 pb.	30
Figura 4.3 – Amplificação da Vac 5'. A- primeira amplificação, 1 – fragmento entre 200 e 300 pb e marcador de 100 pb. B - segunda amplificação, 1 - fragmento entre 100 e 200 pb e marcador de 100 pb.	30
Figura 4.4 – Amplificação da Vac 3', 1 - fragmento de 700 pb e o marcador de 100 pb	31
Figura 4.5 – Esquema da placa de Petri onde foram isoladas as colónias para a MDH 3', MDH 5' e Vac 5'.	32
Figura 4.6 – PCR de confirmação da correcta inserção e clonagem dos fragmentos. Com marcador de 100 pb, de 1-3 – MDH 3' e de 4-7 – MDH 5'	32
Figura 4.7 – PCR de confirmação da correcta inserção e clonagem dos fragmentos. Com marcador de 100 pb, de 8 – MDH 5' e de 9-13 – Vac 5'	32
Figura 4.8 – Esquema da placa de Petri onde foram isoladas as colónias para a MDH 3' e Vac 3', segunda tentativa.....	33
Figura 4.9 – PCR de confirmação da correcta inserção e clonagem dos fragmentos, segunda tentativa. A- MDH 3'; B- Vac 3'	33

Figura 4.10 – Esquema da placa de Petri onde foram isoladas as colónias para a MDH 3' e Vac 3', terceira tentativa.	34
Figura 4.11 – PCR de confirmação da correcta inserção e clonagem dos fragmentos, segunda tentativa. A e B - MDH 3' e C e D – Vac 3'.	34
Figura 4.12 – PCR de confirmação da correcta extracção dos plasmídeos recombinantes. 1 e 2 - MDH 3', B e 4 – MDH5', 9 e 11 – Vac 5' e C – Vac 3'.	35
Figura 4.13 – PCR de confirmação da correcta extracção dos plasmídeos recombinantes, segunda extracção para a Vac 5'.	35
Figura 4.14 – Sequência nucleotídica de cDNA e sequência aminoacídica deduzida para a NAD-MDH citosólica da <i>Annona cherimola</i>	38
Figura 4.15 – Resultado da colocação da ORF da MDH da <i>Annona cherimola</i> no programa Search for Conserved Domain da NCBI.	39
Figura 4.16 – Sequência nucleotídica de cDNA e sequência aminoacídica deduzida para a Vac H ⁺ ATPase da <i>Annona cherimola</i>	40
Figura 4.17 – Resultado da colocação da ORF da Vac H ⁺ ATPase da <i>Annona cherimola</i> no programa Search for Conserved Domain da NCBI.	41

Lista de Abreviaturas

3' RACE	amplificação rápida da extremidade 3' do cDNA
5' RACE	amplificação rápida da extremidade 5' do cDNA
3'UTR	região 3' não traduzida
5'UTR	região 5' não traduzida
μL	microlitro
Água mQ	água ultra pura
ATP	adenosina trifosfato
°C	graus centígrados
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	ácido desoxirribonucleico
ddNTP's	didesoxirribonucleotídeos trifosfatados
dNTP's	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
F ATPase	ATPase do tipo F ou ATP sintase
MDH 3'	fragmento de DNA proveniente da amplificação da extremidade 3' da malato desidrogenase
MDH 5'	fragmento de DNA proveniente da amplificação da extremidade 5' da malato desidrogenase
MDH	malato desidrogenase
min	minuto
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NAD	dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADP	dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfatado
NAD-MDH	MDH dependente do NAD
NADP-MDH	MDH dependente do NADP

ng	nanograma
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
PEPC	fosfoenolpiruvato carboxilase
pr	primer
RACE	amplificação rápida das extremidades de cDNA
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
s	segundos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SP1	primer específico 1 para amplificar a extremidade 5'
SP2	primer específico 2 para amplificar a extremidade 5'
SP3	primer específico 3 para amplificar a extremidade 5'
SP5	primer específico para amplificar a extremidade 3'
SPn	primer específico n para amplificar a extremidade 3'
Ta	temperatura de emparelhamento
Tm	temperatura de fusão
Vac 3'	fragmento de DNA proveniente da amplificação da extremidade 3' da H ⁺ ATPase vacuolar
Vac 5'	fragmento de DNA proveniente da amplificação da extremidade 5' da H ⁺ ATPase vacuolar
Vac H⁺ ATPase	H ⁺ ATPase vacuolar

1. Introdução

O fruto da *Annona cherimola* Miller apresenta características organolépticas com muita qualidade e é considerado um fruto de sobremesa. Contudo pode ser utilizado para a produção de gelados, compotas, xaropes e bebidas [1].

Por este facto, a *Annona cherimola* é uma cultura com muito interesse económico no mundo. Porém, os seus frutos possuem uma grande desvantagem, nomeadamente a sua elevada perecibilidade após a colheita [2].

Na ilha da Madeira a cultura da anoneira é muito importante a nível comercial, sendo os seus frutos considerados de excelente qualidade [3].

O processo de amadurecimento é muito importante para a qualidade final dos frutos. Durante o amadurecimento ocorrem uma série de modificações fisiológicas, bioquímicas e organolépticas [4]. Estas modificações são o resultado de uma complexa rede de reacções irreversíveis que envolvem a degradação de elementos estruturais da célula e a síntese de vários compostos que intervêm neste processo [5].

Na *Annona cherimola*, ao contrário da maioria dos frutos, observa-se um aumento da acidez titulável. Este facto deve-se em grande parte ao contributo do ácido málico, embora o ácido cítrico também esteja presente. O equilíbrio entre os ácidos orgânicos e os açúcares originam o sabor agradável deste fruto [6].

A enzima malato desidrogenase (MDH) dependente do NAD catalisa a reacção reversível do oxaloacetato em malato. Este malato é utilizado em diversos processos pelas células, estando muito presente nas células durante o amadurecimento dos frutos [7].

A MDH está presente em vários processos essenciais para a sobrevivência das plantas, tais como o ciclo de Krebs, a fotorespiração, troca de metabolitos e várias vias catabólicas e anabólicas [8].

Por outro lado, a H^+ ATPase vacuolar (Vac H^+ ATPase) é uma bomba electrogénica, localizada nos vacúolos [9]. Tem por função acidificar os compartimentos intercelulares, sendo por isso muito importante para vários processos. Como por exemplo, o co-transporte, e o desenvolvimento e a tolerância ao stress ambiental [10].

No fenómeno de amadurecimento do fruto da *Annona cherimola*, a Vac H^+ ATPase acumula ácidos orgânicos nos vacúolos, aumentando desta forma, a basicidade do citoplasma [11].

O principal objectivo deste trabalho passa pela caracterização das sequências nucleotídicas dos genes que codificam para as enzimas malato desidrogenase dependente do NAD citosólica e H^+ ATPase vacuolar, que são expressas durante o processo de amadurecimento dos frutos. Para tal, vai ser utilizada a amplificação

rápida das extremidades de cDNA (RACE), pois este é um método rápido e económico de obter as sequências de cDNA. De seguida clonar estes fragmentos obtidos e sequenciá-los. Por fim, procederemos a uma análise das sequências obtidas.

Com este trabalho pretende-se conhecer um pouco melhor as sequências nucleotídicas dos cDNAs de duas enzimas que são expressas no processo de amadurecimento da *Annona cherimola*.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. *Annona cherimola* Miller

A família *Annonaceae* pertence à ordem das *Magnoliales*, classe *Magnoliopsida*. Esta família apresenta plantas com flor mais primitivas, contendo 126 géneros e cerca de 1200 espécies [12].

As principais espécies de *Annonaceae* são a *Annona squamosa*, a *Annona muricata*, a *Annona reticulata* e a *Annona cherimola*, devido ao seu valor comercial [13].

A *Annona cherimola* Miller é originária da região dos Andes, no Equador e no Peru. Actualmente encontra-se distribuída pelas regiões subtropicais da América, África, Ásia e na Europa, onde é cultivada pelos seus frutos comestíveis. A *Annona cherimola* é a única espécie do género *Annona* que se consegue desenvolver em regiões subtropicais [14], [15].

Esta espécie de *Annona* é montanhosa, demonstrando estar bem adaptada a baixas temperaturas, podendo inclusive se encontrar esta espécie entre os 900 e os 2500 metros de altitude. Esta é uma das razões que levam à sua adaptação às regiões subtropicais da região Mediterrânica. Todavia as temperaturas ideais situam-se entre os 18 e os 22 °C no Verão e os 5 e 18 °C no Inverno. A sua propagação costuma fazer-se por enxertia, tanto nas regiões de clima temperado como nas de clima tropical [16].

A árvore desta espécie *Annona* apresenta as seguintes características morfológicas: altura entre 3 e 10 metros; sistema radicular superficial e ramificado; tronco cilíndrico com casca grossa, lisa e com uma coloração verde acinzentada; ramos densos e com tendência a se inclinar, tornando a planta com um porte globoso; folhas ovais, ovais-lanceoladas, obovadas ou elípticas, não pontuadas e sedosa e com uma cor verde e flores solitárias ou reunidas em grupos de 2 a 4, terminais ou axilares, hermafroditas, aromáticas, com 3 sépalas e 3 a 6 pétalas [6], [16], [17].

A anoneira é considerada semicaduca pois apresenta-se sempre com folhas. A queda das folhas existe devido à pressão que os novos rebentos exercem no pecíolo, apresentando por isso um pecíolo oco [6], [16].

As flores de *Annona cherimola* são hermafroditas, sendo a sua polinização dificultada pelo fenómeno de dicogamia. Neste caso, este fenómeno é de protoginia, ou seja, os estigmas desenvolvem-se primeiro do que as anteras. Este facto aumenta a diversidade dentro das populações devido à polinização cruzada. Os estigmas tornam-se receptivos de manhã, mas as anteras só amadurecem e largam o pólen na noite do dia seguinte [18], [19], [20].

O fruto desta anona é um sincarpo em que cada carpelo contém geralmente um óvulo. O fruto muitas vezes apresenta uma forma assimétrica, semelhante a um coração. Os frutos medem entre 7,5 e 12,5 centímetros e têm um peso que varia entre as 200 e os 700 gramas. A sua superfície é lisa em algumas variedades, contudo em outras apresenta-se coberta de pequenas protuberâncias ao longo dos carpelos. A casca do fruto é amarela esverdeada, quando madura, tem uma polpa branca e numerosas sementes com 1,5 a 2,0 centímetros de comprimento [16], [21].

Nos frutos das anonas existem três camadas diferentes, o epicarpo, o mesocarpo e o endocarpo. O epicarpo é a camada mais externa, originário da epiderme do carpelo, é conhecido vulgarmente por casca. Por sua vez o mesocarpo é a camada intermédia, logo após o epicarpo, tem origem no mesófilo carpelar e armazena amido, como substância de reserva. Por fim, o endocarpo é a camada que envolve as sementes e provém da epiderme interna da folha carpelar [6].

A colheita do fruto é realizada à mão quando o fruto começa a amadurecer, sendo que nesta altura exala um odor distinto e característico. Existe também uma mudança na tonalidade do verde da casca, apesar de esta ser subtil e muitas vezes de difícil avaliação. Após a colheita o fruto é muito perecível, sendo a sua viabilidade de apenas 3 a 4 dias, a uma temperatura de 20°C e com uma humidade relativa de 60%. Por este facto, usualmente armazenam-se os frutos logo após a colheita numa câmara frigorífica, de modo a poder conservá-los por mais algum tempo [22].

A *Annona cherimola* é uma cultura com muito interesse económico no mundo, devido às excelentes qualidades organolépticas do seu fruto. Contudo a sua elevada perecibilidade e a sua colheita de apenas 2 meses limitam a sua comercialização [2], [23].

2.2. *Annona cherimola* na Região Autónoma da Madeira

Na literatura de Sousa [6] afirma-se que a primeira referência documentada acerca da *Annona cherimola* na Madeira aparece em 1897, no Journal of the Jamaica Agricultural Society, por M. Grabham. A “Anona da Madeira” foi o primeiro produto na Região Autónoma da Madeira a ter denominação de origem protegida, o que reflecte a sua importância em termos económicos. De uma forma geral, a produção deste fruto tem vindo a aumentar, bem como o número e dimensão das áreas de cultivo. Este aumento decorre das medidas de incentivo e numa aposta vincada das autoridades regionais na sua produção. Em termos de exportações, a anona ocupa o segundo lugar em relação aos produtos mais vendidos para o mercado nacional e internacional, em

especial para países como Espanha e França, onde nos últimos anos se tem assistido a um aumento da procura por este fruto.

Na Região Autónoma da Madeira a cultura da anoneira é muito importante a nível económico. O fruto é alvo de muita procura no mercado regional, pois apresenta elevada qualidade organoléptica. Esta qualidade baseia-se no equilíbrio entre um ligeiro sabor doce e uma leve acidez, apresentando por isso, um grande potencial em relação ao mercado internacional [3].

Cerca de 80% da cultura encontra-se entre os 280 e os 550 metros de altitude, a sudeste e nordeste da ilha da Madeira. Esta distribuição apresenta-se condicionada pela orografia da ilha, já que a vertente norte está mais exposta aos ventos predominantes de Norte e Nordeste que afectam a ilha durante a maior parte do ano, contrariamente ao sul que se encontra mais protegido. Assim sendo, as condições existentes nesta ilha para a produção do fruto são uma humidade relativa que varia entre os 60 e os 80%, e temperaturas que variam entre 8°C e 18°C no Inverno e entre os 18°C e os 26°C no Verão. A época de produção ocorre habitualmente nos meses de Outubro e Novembro, sendo a época alta entre Janeiro e Fevereiro. Contudo existe produção do fruto até ao mês de Junho [6].

2.3. Amadurecimento dos frutos

Os frutos são órgãos altamente especializados das plantas superiores, que oferecem uma grande variedade de qualidades organolépticas (aroma, sabor agradável, cores exóticas, suculência e textura) [5].

O amadurecimento dos frutos pode ser classificado em dois grupos: os frutos não climatéricos e os frutos climatéricos. Nos frutos não climatéricos, como os morangos, uvas e citrinos, não é necessária a presença de etileno para que o amadurecimento ocorra. Por isso o nível de etileno é mantido em baixas concentrações, embora alguns citrinos possam responder ao etileno. Pelo contrário nos frutos climatéricos como o tomate, a banana, o pêsego, maçã e a anona constata-se um aumento nas taxas de respiração e biossíntese de etileno durante o amadurecimento. O etileno é essencial para a coordenação e execução do amadurecimento de frutos climatéricos, estando presente em elevadas concentrações durante o amadurecimento. Esta função crítica que o etileno desempenha no amadurecimento dos frutos foi observada pela primeira vez a nível molecular no tomate, através da análise do etileno induzível, na expressão dos genes relacionados com o amadurecimento [24].

Todas as Anonas são frutos climatéricos, mas a *Annona cherimola* apresenta dois picos de respiração, em vez de apenas um como em todos os outros frutos deste grupo. O fruto da *Annona cherimola* também liberta mais etileno e apresenta uma taxa metabólica mais elevada, diminuindo desta forma o tempo médio de vida pós-colheita [17]. A curva de respiração para a *Annona cherimola* apresenta dois picos de produção de dióxido de carbono, sendo que os frutos alcançam o estado comestível perto do segundo pico. Verificou-se que existe um pico de produção de etileno entre os dois picos respiratórios e constatou-se que o amaciamento dos frutos começa a partir da síntese do etileno. Por fim, os frutos estão completamente maduros no pico do etileno [25].

O etileno é uma fito-hormona que, em alguns minutos, consegue desencadear uma série de eventos no metabolismo celular, incluindo a iniciação do amadurecimento e a senescência do fruto, particularmente nos frutos climatéricos [5].

O etileno apresenta um papel importante na regulação da maturação dos frutos, as mudanças na textura da fruta podem ser categorizadas como etileno dependente, parcialmente etileno dependente ou etileno independente. Os factores de resposta do etileno são uma família de factores de transcrição (potenciais reguladores da resposta do etileno) e ainda apoiam o importante papel na sinalização do etileno ao longo do amolecimento da fruta [26], [27].

Existem dois sistemas de produzir etileno nas plantas. O sistema 1 funciona durante o desenvolvimento, crescimento e na resposta ao stress, este sistema é auto inibitório, pois a presença de etileno exógeno inibe a sua síntese e substâncias inibidoras do etileno podem estimular a produção de etileno. Por outro lado, o sistema 2 funciona durante o amadurecimento e senescência dos frutos. Este sistema é estimulado pela presença de etileno e por isso autocatalítico, na presença de compostos inibidores do etileno interrompe a síntese de etileno. As vias de sinalização que regulam o amadurecimento dos frutos permanecem muito pouco estudadas, com a excepção do etileno. A biossíntese de etileno é realizada através da metionina em três passos [28], [29]:

- 1- Conversão da metionina em S-adenosil-L-metionina (SAM) catalisada pela enzima SAM sintetase;
- 2- Formação do ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) a partir da SAM através ACC sintase;
- 3- Conversão da ACC em etileno pela ACC oxidase.

O tomate é o fruto climatérico mais estudado ao nível do processo de amadurecimento. No tomate ocorre uma mudança de cor, um pico respiratório, um aumento elevado na produção de etileno, amolecimento da sua textura e uma

diminuição dos ácidos. O etileno funciona como um promotor da transcrição e tradução de muitos genes envolvidos no amadurecimento do fruto [30], [31], [32].

Para a *Annona cherimola*, a produção de etileno é um evento tardio, estando o amadurecimento associado com um amolecimento da textura do fruto e um aumento no conteúdo dos sólidos solúveis e na acidez titulável [33]. Neste fruto, o etileno funciona mais como coordenador do que como iniciador para muitas das modificações que ocorrem no amadurecimento [34].

O amadurecimento dos frutos é um fenómeno irreversível, envolvendo uma série de mudanças fisiológicas, bioquímicas e organolépticas que levam ao desenvolvimento de um fruto maduro, macio e comestível. Existe uma grande variedade de alterações bioquímicas, tais como: o aumento da respiração, a degradação da clorofila, biossíntese de carotenóides, antocianinas, óleos essenciais e componentes do sabor e aroma e também um aumento transitório na produção de etileno [35], [36].

A mudança de cor acontece devido à degradação da clorofila e ao desmantelamento do aparelho fotossintético e síntese de vários tipos de antocianinas, que posteriormente são armazenadas nos vacúolos. Ocorre também a acumulação de carotenóides, como o β -caroteno, ésteres de xantofila, xantofila e licopeno. Já o aumento de sabor e aroma deve-se à produção de um complexo de compostos voláteis como o ocimeno e o mirceno e também à degradação de princípios amargos como por exemplo os flavonóides. O desenvolvimento do gosto provém do aumento geral da doçura, que resulta do aumento da gliconeogénese, hidrólise dos polissacarídeos, especialmente o amido, decréscimo na acidez e armazenamento de açúcares e ácidos orgânicos [34], [36].

Na parede celular encontram-se vários polissacarídeos tais como, pectinas, celuloses, hemiceluloses, polissacarídeos de reserva, entre os quais amido e galactomananas. Também existem formadores de gel, por exemplo, gomas e mucilagens e por fim transportadores de informação fisiológica como os antigénios. Ou seja, existe um conjunto muito diverso de elementos que apresentam um papel fundamental como elementos estruturais. Por esta razão, a degradação destes polissacarídeos desempenha um papel muito importante durante o amolecimento da textura, que se verifica no amadurecimento dos frutos. As mudanças na composição da parede celular ocorrem devido à acção das carbohidrolases, que actuam nos polímeros da parede celular, degradando-os. A maioria destas enzimas está presente de forma constitutiva, embora em baixas concentrações, ao longo do desenvolvimento e amadurecimento dos frutos. Outra enzima importante é a poligalacturonase (PG), que despolimeriza a pectina, levando a uma progressiva perda da firmeza do tecido [5].

Os ácidos orgânicos acumulam-se nas fases iniciais do desenvolvimento dos frutos e são utilizados na respiração, como substratos, durante o seu amadurecimento. Os ácidos orgânicos que são mais sintetizados são o ácido cítrico e o ácido málico. A concentração final dos ácidos orgânicos num fruto maduro é a consequência do equilíbrio que ocorre entre a biossíntese dos ácidos orgânicos, a sua degradação e o seu armazenamento nos vacúolos celulares. A concentração dos ácidos é essencial para as características organolépticas do fruto [37].

A síntese do ácido málico ocorre no citoplasma e é catalizada pela fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) que produz o oxaloacetato e a MDH que converte o oxaloacetato em malato, sendo este a forma ionizada do ácido málico [37]. A actividade da PEPC é modelada por mudanças no valor de pH [38]. Por sua vez, se a PEPC diminui a sua actividade, existe menos oxaloacetato, logo a actividade da MDH também irá ser afectada [39].

A variação da acidez e doçura do ananás dependem das condições de crescimento e maturação. A acidez aumenta ao longo do crescimento do fruto e a medida que o fruto começa a amadurecer a acidez começa a diminuir. O ácido cítrico demonstra grandes modificações durante o crescimento do fruto e atinge o seu pico máximo mesmo antes do amadurecimento. Por sua vez, o ácido málico apresenta poucas variações durante o desenvolvimento [40].

No melão, o açúcar e ácidos orgânicos encontrados nas frutas maduras produzem um equilíbrio entre o sabor ácido e doce que são essenciais para o paladar do consumidor. O alto teor de ácidos orgânicos reduz a qualidade da fruta, mas uma moderada concentração destes ácidos podem tornar o seu paladar mais apelativo para os consumidores. O ácido orgânico mais abundante neste fruto é o ácido cítrico [41].

Durante o processo de amadurecimento as concentrações de ácidos orgânicos diminuem. Contudo, na *Annona*, observa-se um aumento da acidez titulável. Os principais responsáveis são o ácido málico e o ácido cítrico [6].

O ácido málico é o principal causador dessa acidez, devendo-se este facto à presença de grandes vacúolos na anona que actuam temporariamente como reservatórios para armazenar o ácido málico sintetizado. Após a colheita verifica-se que o fruto da *Annona cherimola* apresenta o metabolismo do malato activo e um valor de pH citoplasmático baixo. Este facto demonstra que o sistema de descarboxilação do malato tem um papel importante nesta fase do amadurecimento. Durante o amadurecimento também existe um aumento na concentração da poliaminas, que pode ser explicado pela necessidade de aumentar a basicidade do citoplasma [11].

O amadurecimento dos frutos também pode ser controlado através de factores físicos, nomeadamente a temperatura, a humidade, o controlo da atmosfera de armazenamento e a irradiação.

Uma baixa temperatura normalmente inibe o amadurecimento e senescência do fruto. Isto acontece devido à inibição de várias enzimas envolvidas na iniciação e regulação do amadurecimento, incluindo as que estão ligadas à sinalização e biossíntese do etileno e muitas enzimas específicas do processo de maturação dos frutos. Se sujeitarmos os frutos a um tratamento por calor, este pode induzir modificações na textura do fruto [42].

Os frutos guardados sob condições de humidade relativa (RH) baixa podem perder facilmente água ou massa, que resulta no emurchecimento do fruto. Por outro lado, também pode ser biossintetizado etileno relacionado com factores que provocam stress, acelerando desta forma a maturação dos frutos [43].

O controlo da atmosfera de armazenamento é realizado através da introdução de oxigénio e dióxido de carbono, regulando-os de forma precisa dentro de uma câmara. Com a utilização de um baixo nível de oxigénio é possível atrasar o processo de amadurecimento de muitos frutos. Este controlo de atmosfera é muito utilizado para tentar diminuir o rápido amadurecimento das anonas, após a colheita [44].

A irradiação pode ser utilizada nos frutos de forma a desinfectá-los. Contudo, este processo pode desencadear a ruptura de componentes celulares e mudanças nas estruturas das mesmas, diminuindo a qualidade final do fruto [45].

O fruto da *Annona cherimola* é colhido comercialmente quando se encontra na fase madura pré-climatérica, sendo depois conservado a baixas temperaturas. Desta forma é possível aumentar o seu tempo médio de vida [46].

No caso da banana, este fruto sofre muitas modificações físico-químicas durante o amadurecimento. Estas modificações estão dependentes da expressão de genes específicos e a síntese de novo de muitas enzimas. Como por exemplo, a expressão dos genes das enzimas ACS e ACO, que produzem o etileno, genes envolvidos no metabolismo dos hidratos de carbono e na síntese de compostos voláteis [47].

O fruto da *Annona cherimola* atinge a qualidade óptima no terceiro dia após a colheita. Quando o fruto se encontra demasiado maduro começam a aparecer manchas escuras na polpa, especialmente na zona do receptáculo, a polpa torna-se um pouco translúcida e o sabor exhibe uma doçura excessiva. Isto ocorre devido à excessiva degradação da parede celular e à degradação do amido [48].

As mudanças metabólicas mais importantes no amadurecimento da *Annona cherimola* são a hidrólise do amido, que leva à acumulação de glicose e frutose e a degradação da parede celular. Observações microestruturais do mesocarpo evidenciam uma deterioração progressiva dos organelos e membranas na senescência do fruto [49].

Após estudos verificou-se que nos frutos conservados a 6 °C existe uma menor taxa de respiração do que nos frutos armazenados a 20 °C. Nos frutos a 20 °C verifica-se uma maior acumulação de fosfato inorgânico nos vacúolos e uma baixa quantidade de fosfato inorgânico no citoplasma. A colocação de tecidos do mesocarpo do fruto num meio com fosfato revelou que nos frutos conservados a 6 °C não existe a sequestração desse fosfato para o interior dos vacúolos. Pelo contrário, nos tecidos dos frutos armazenados a 20 °C existe um aumento da acumulação de fosfato inorgânico. Levando a inferir que será necessário utilizar as ATPases para colocar os ácidos orgânicos e outros compostos nos vacúolos, mantendo desta forma a regulação do pH citoplasmático. [50].

Neste fruto também se observa que existe uma rápida degradação das clorofilas, pela acção das clorofilases. Tanto a clorofila a como a clorofila b apresentaram uma clara degradação durante o processo de amadurecimento [6].

2.4. Malato desidrogenase

A MDH (L-2-hidroxi ácido desidrogenase) é uma enzima ubíqua, isolada a partir de vários organismos procarióticos e eucarióticos. Esta enzima catalisa a reacção reversível do oxaloacetato a malato. As plantas apresentam isoenzimas de MDH com o co-factor dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD) que são muito activas no citosol, mitocôndrias, microcorpos e plastídeos [51], [52].

Tanto a malato como a lactato desidrogenases pertencem à classe homóloga de 2-ceto ácido desidrogenases e apresentam estruturas tridimensionais praticamente idênticas. Nalgumas espécies a sequência nucleotídica é muito semelhante [53].

Esta enzima está presente em vários processos essenciais para a sobrevivência das plantas, tais como o ciclo de Krebs, a fotorespiração, troca de metabolitos e em várias vias catabólicas e anabólicas [54]. O malato sintetizado pela MDH também pode controlar a abertura dos estomas, melhorar a nutrição da planta e aumentar a resistência a toxicidade provocada por metais pesados [55].

Nas plantas a MDH, faculto malato ao metabolismo C_4 , equilibra o pH, intervém na respiração e β -oxidação dos ácidos gordos. Por esta razão, a enzima apresenta muitas isoformas em diversos organelos [56].

Nas plantas existem várias formas moleculares que diferem na especificidade da co-enzima. Existem 5 classes que são [57]:

- 1- **MDH dependente do NADP (NADP-MDH) cloroplastidial** (EC 1.1.1.82) é responsável pela síntese do malato que é transportado para dentro dos cloroplastos.
- 2- **MDH dependente do NAD (NAD-MDH) mitocondrial** faz parte do ciclo de Krebs e também participa na fotorespiração.
- 3- **MDH dependente do NAD (NAD-MDH) dos microcorpos** está presente no ciclo do glioxilato e no ciclo malato-aspartato, que é essencial para a fotorespiração.
- 4- **MDH dependente do NAD (NAD-MDH) cloroplastidial.**
- 5- **MDH dependente do NAD (NAD-MDH) citosólica** (EC 1.1.1.37) pertence a vários ciclos que permitem troca de substratos e equivalentes de redução entre o citoplasma e organelos celulares.

Estas MDHs podem ser classificadas em duas subfamílias, a primeira subfamília compreende as NADP-MDH cloroplastidial e as NAD-MDH citosólica. Já a outra subfamília é composta pelas MDHs das mitocôndrias, microcorpos e NAD-MDH cloroplastidiais [58].

Nas sequências de aminoácidos de MDHs existe uma divergência filogenética nos dois principais grupos de enzimas, as MDHs mitocondriais e MDHs citoplasmáticas. Na família MDH, a enzima mitocondrial é mais parecida com o seu homólogo procaríota, do que com a MDH citoplasmática. Este facto indica que existiu uma divergência recente do ancestral comum [59].

As MDHs são dímeros estáveis, indicando uma correlação entre a estabilidade da proteína e a sua actividade enzimática. Cada subunidade contém dois domínios distintos, estrutural e funcionalmente. O domínio de ligação NAD, ocupa a metade amino terminal de cada molécula e apresenta uma estrutura paralela em folha β . A estrutura de ligação ao NAD é composta por 4 folhas β e uma α hélice. Este domínio de ligação ao NAD é conservado em alguma extensão noutras desidrogenases. O domínio carboxi-terminal contém o local de ligação ao substrato e aminoácidos que são essenciais para a catálise. O sítio activo destas enzimas localiza-se no espaço entre os dois domínios. Este sítio activo contém os locais de ligação para o substrato e para a co-enzima [59].

Yao [60] investigou o gene que codifica a MDH para a maçã e descobriu que o cDNA isolado apresentava um comprimento total de 1387 pares de bases (pb), com 149 pb na região 5' não traduzida (5'UTR), 239 pb na região 3' não traduzida (3'UTR) e 996 pb na zona codificante (ORF). O esquema desse gene encontra-se na figura 2.1.

Yao [60] também observou que este gene era expresso constitutivamente nas raízes, caules e folhas e participava directamente na regulação da síntese do malato e indirectamente modula o transporte do malato, a degradação e o metabolismo no ciclo de Krebs.

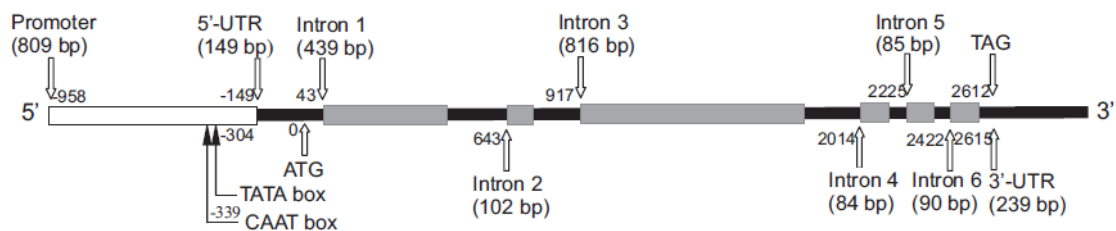


Figura 2.1 – Esquema do gene da MDH para a maçã (retirado de Yao [60]).

Na *Annona cherimola* a expressão do gene da NAD-MDH citosólica mostra uma pequena redução do segundo para terceiro dia, seguindo-se um ligeiro aumento depois até ao quinto dia, sendo que a expressão atinge o seu máximo nesse dia. Revelando assim um ligeiro aumento ao longo do amadurecimento. A diminuição que existe do segundo para o terceiro dia está relacionada com a diminuição do oxaloacetato, pois existe uma diminuição na actividade da PEPC até ao terceiro dia. Os transcritos de MDH mantêm-se elevado durante o amadurecimento. O que leva a concluir que existe uma expressão contínua da MDH no fruto durante o amadurecimento [39].

2.5. H⁺ ATPase vacuolar

O vacúolo é o organelo mais importante para a qualidade de um fruto, devido ao seu tamanho grande e os compostos responsáveis pelo sabor do fruto se encontram dentro do vacúolo em concentrações muito elevadas. Estes compostos são açúcares, ácidos orgânicos e metabolitos secundários [61].

A Vac H⁺ ATPase está localizada nas endomembranas das células eucarióticas, ou seja, nos vacúolos, lisossomas, no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi. Por este facto a Vac H⁺ ATPase é considerada uma enzima ubíqua [62], [63], [64], [65].

Esta enzima é a principal proteína nos tonoplastos das plantas, representando entre 6,5 e 35% das proteínas totais dos tonoplastos [66].

A Vac H⁺ ATPase é uma bomba electrogénica, ou seja, promove uma diferença de potencial entre o interior do vacúolo e o citosol [9]. Devido a este facto é essencial para vários processos, como por exemplo, o co-transporte e o desenvolvimento e tolerância ao stress ambiental. Através da acidificação do vacúolo, fornece energia para o transporte de iões e metabólitos, influenciando desta forma o turgor e a expansão celular [9], [10].

A acidificação dos organelos intracelulares é importante para muitos processos celulares. Como por exemplo, o transporte de proteínas para os locais onde são necessárias dentro da célula, endocitose mediada por um receptor, activação dos precursores enzimáticos, armazenamento de nutrientes, homeostase iónica, degradação de macromoléculas e acumulação de neurotransmissores nas vesículas secretórias [67], [68].

Nas fibras de algodão a enzima Vac H⁺ ATPase promove a o alongamento celular, através da regulação do turgor orientado permitindo a expansão da polaridade de uma fibra celular única [69].

Nos tonoplastos das plantas, a força motriz formada a partir da energia que deriva da hidrólise do ATP é utilizada para processos de transporte secundários. Estes processos contribuem para a osmorregulação, homeostase iónica, armazenamento de nutrientes, manutenção do pH intracelular, crescimento celular e também na defesa contra o stress ambiental (salinidade, períodos de seca e solos com elevada concentração de metais pesados) [9].

Segundo Wilkens [70] e Grüber [71], esta enzima apresenta um peso molecular elevado, sendo constituída por dois domínios (ver figura 2.2), um integrado na membrana do vacúolo V₀ e o outro é periférico V₁. Estes dois domínios estão ligados através de domínio conjunto que funciona como conexão estrutural e funcional. O domínio V₀ permite o fluxo de protões e apresenta 5 subunidades (a, c, c', c'' e d). Já o domínio V₁ está localizado no citoplasma, é hidrofílico e possibilita a hidrólise do ATP. O V₁ é formado por 8 polipéptidos (A, B, C, D, E, F, G, e H), sendo que a subunidade A é o sítio catalítico de ligação ao ATP e a subunidade H tem uma função de regulação.

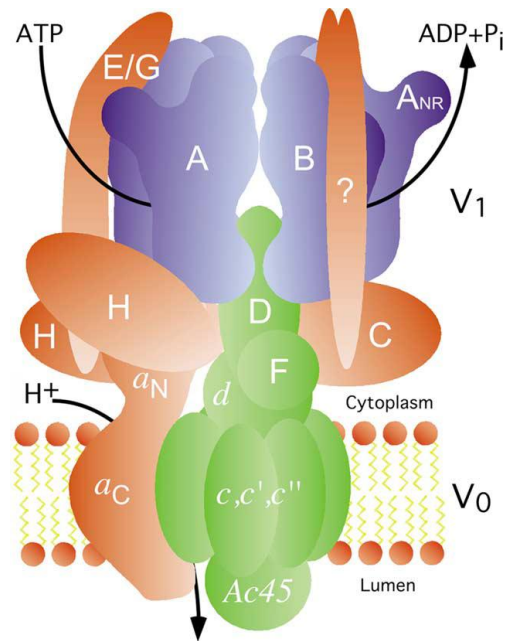


Figura 2.2 – Representação esquemática da Vac H^+ ATPase (retirado de Wilkens [64]).

O mecanismo importante na regulação da actividade da Vac H^+ ATPase é a dissociação reversível do complexo enzimático nos seus domínios V_0 e V_1 . A estrutura do domínio V_1 isolado do V_0 apresenta semelhanças com o complexo F1 da ATPase do tipo F (F ATPase) [71].

A enzima Vac H^+ ATPase pertence à família das bombas iónicas que hidrolisam o ATP. A família destas bombas iónicas é dividida em três subfamílias [70]:

- F ATPases, que funcionam geralmente como sintetases de ATP;
- ATPases eucarióticas vacuolares, que funcionam somente na hidrólise do ATP
- ATPases do tipo A, das Archaea, que podem realizar tanto a síntese como a hidrólise do ATP.

O padrão de expressão da Vac H^+ ATPase é consistente com os padrões de armazenamento dos ácidos orgânicos, isto sugere que a Vac H^+ ATPase decide a acidez dos frutos [61].

Para a *Annona cherimola*, observa-se um aumento gradual na expressão do gene da Vac H^+ ATPase durante o amadurecimento. A sua expressão mantém a homeostase do fruto, pois armazena os ácidos orgânicos produzidos no vacúolo. Este armazenamento ocorre devido à criação de um gradiente de protões que impulsiona a malato e o citrato através do tonoplastos [39].

2.6. Poliadenilação

O processo de poliadenilação faz parte da produção de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) para a posterior tradução. Este ocorre após terminar a transcrição, contendo uma clivagem e posterior adição de adeninas na extremidade 3' do mRNA recém-formado [72].

A poliadenilação tem como função proteger o mRNA das ribonucleases e também está envolvido no processo de transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma [73].

Existem elementos de regulação cis (*Cis-acting*) que codificam sinais para que a poliadenilação ocorra. Nas plantas os sinais que motivam o corte e a poliadenilação do mRNA encontram-se, normalmente, entre 10 a 30 nucleótidos 3' do motivo AAUAAA ou AUUAAAA [74].

Para que a poliadenilação seja executada de forma correcta são necessários factores proteicos. O factor específico de clivagem e poliadenilação apresenta várias subunidades e reconhece o sinal de poliadenilação (AAUAAA), sendo necessário tanto na clivagem como na poliadenilação. Por outro lado, o factor estimulatório da clivagem intervém na clivagem e estabiliza a interacção entre o sinal de poliadenilação e o factor específico de clivagem e poliadenilação, através de interacções proteína-proteína e proteína-RNA [75].

3. Material e Métodos

3.1. Desenho dos primers

Os primers foram desenhados a partir de pequenos fragmentos de DNA (DNA molde), que a Professora Doutora Manuela Gouveia já tinha obtido em trabalhos anteriores. Para a MDH esse fragmento continha 388 pares de bases (pb), enquanto para a Vac H⁺ ATPase eram de 327 pb. Esses fragmentos encontram-se nos Anexos.

Utilizando o software de livre acesso, Oligo Explorer 1.2 e Oligo Analyzer 1.2, foi possível encontrar nos fragmentos as sequências de pb que mais se adequavam para actuar como primers durante a técnica RACE.

Na escolha dos primers foram tidos em consideração vários parâmetros, como o comprimento, que deveria estar entre 18 e os 24 pb; a percentagem de guaninas e citosinas, que deveriam estar situadas entre os 40 e os 60 %, a não formação de “loops” e as cadeias de DNA não serem auto-complementares entre si.

Após o desenho dos primers realizou-se uma estimativa, com o recurso às bases de dados do NCBI e do EMBL, relativamente ao tamanho que os fragmentos iriam ter após a realização da RACE. Para tal alinou-se o DNA molde da *Annona cherimola* com os genes já conhecidos de MDH e Vac H⁺ ATPase de outras espécies. O tamanho esperado para as extremidades amplificadas por RACE, com os primers específicos, para a MDH e Vac H⁺ ATPase encontram-se descritos na tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Tamanho esperado para as extremidades amplificadas por RACE para a MDH e Vac H⁺ ATPase.

	<i>MDH</i>	<i>Vac H⁺ ATPase</i>	
SP2	581 ± 26 pb	464 ± 93 pb	5' RACE
SP3	377 ± 26 pb	344 ± 93 pb	
SP5	1084 ± 94 pb	705 ± 95 pb	3' RACE
SPn	834 ± 94 pb	-	

3.2. Extracção de RNA

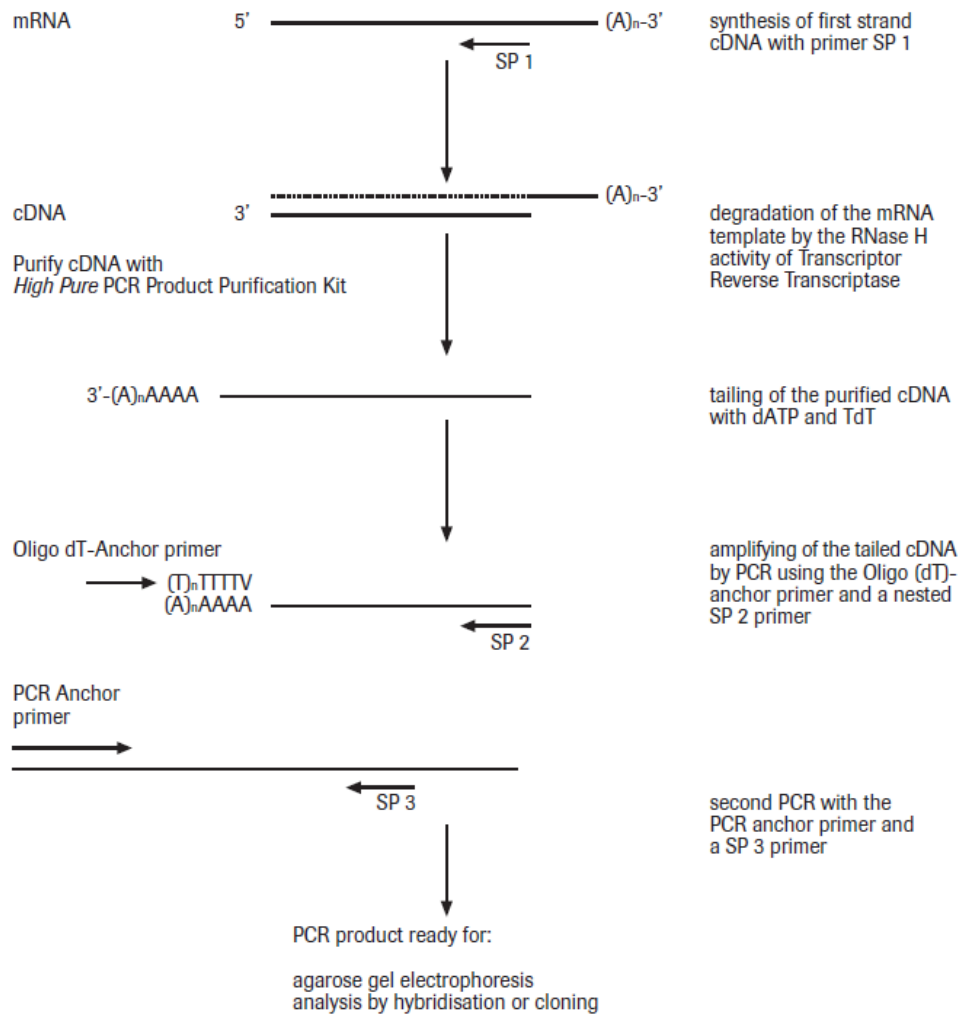
O fruto de *Annona cherimola* utilizado para a extracção de RNA foi colhido durante o mês de Abril de 2010, na zona do Faial (Costa Nordeste da ilha da Madeira).

Congelou-se a amostra de *Annona cherimola* com o auxílio de azoto líquido e de seguida macerou-se o material até ficar em pó. Adicionou-se num tubo 2 mL de tampão de extracção (200 mM acetato de sódio pH 5,2; 10 mM EDTA pH 8,0; 1% SDS), 2 mL de fenol e 0,9 g de material previamente macerado, que se aqueceu durante 5 minutos a 65°C. De seguida vortexou-se durante 5 minutos e posteriormente adicionou-se 2 mL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Em seguida vortexou-se novamente durante 5 minutos. Depois centrifugou-se durante 10 minutos, a 13000 rpm e com uma temperatura de 4°C. Reextraiu-se a fase aquosa com igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), ao que se seguiu uma centrifugação com as mesmas condições da anterior. Recolheu-se a fase aquosa e colocou-se 0,7 mL de cloreto de lítio (8M), que se deixou a repousar a 4°C durante a noite. Posteriormente, procedeu-se à centrifugação durante 10 minutos, a 4°C e a 13000 rpm, ao que se seguiu uma lavagem do precipitado com cloreto de lítio (2M) e uma nova centrifugação nas condições anteriores. Procedeu-se a uma lavagem com acetato de sódio (pH 5,5 e 3M), centrifugou-se e efectuou-se 2 lavagens com etanol a 70 % (na 1ª lavagem 1 mL de etanol e na 2ª 0,5 mL, com uma centrifugação entre cada lavagem). Por fim deixou-se o precipitado secar e dissolveu-se em água mQ esterilizada duas vezes.

Analisou-se a qualidade e quantidade de RNA através da realização de uma electroforese, num gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL), visualizou-se o gel num transiluminador de UV. Verificou-se que o RNA foi apresentava-se com bandas bem definidas e com uma grande intensidade.

3.3. Amplificação rápida das extremidades do cDNA

A técnica RACE permite obter o DNA complementar (cDNA) para as extremidades 5' e 3', ou seja, é possível descobrir a sequência completa do cDNA. O 5' RACE é utilizado para amplificar ou isolar uma parte parcial do cDNA transcrito a partir de uma sequência de mRNA. Na figura 3.1 encontram-se esquematizados os passos necessários para executar esta técnica. Tal como o 5'RACE, o 3' RACE é empregue na amplificação ou isolamento de uma porção cDNA na extremidade 3'. Na figura 3.2 encontra-se esquema do seu procedimento [76].



V = A, C or G

Figura 3.1 – Representação esquemática da amplificação da extremidade 5', utilizando a técnica RACE (retirado do kit 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation, Roche).

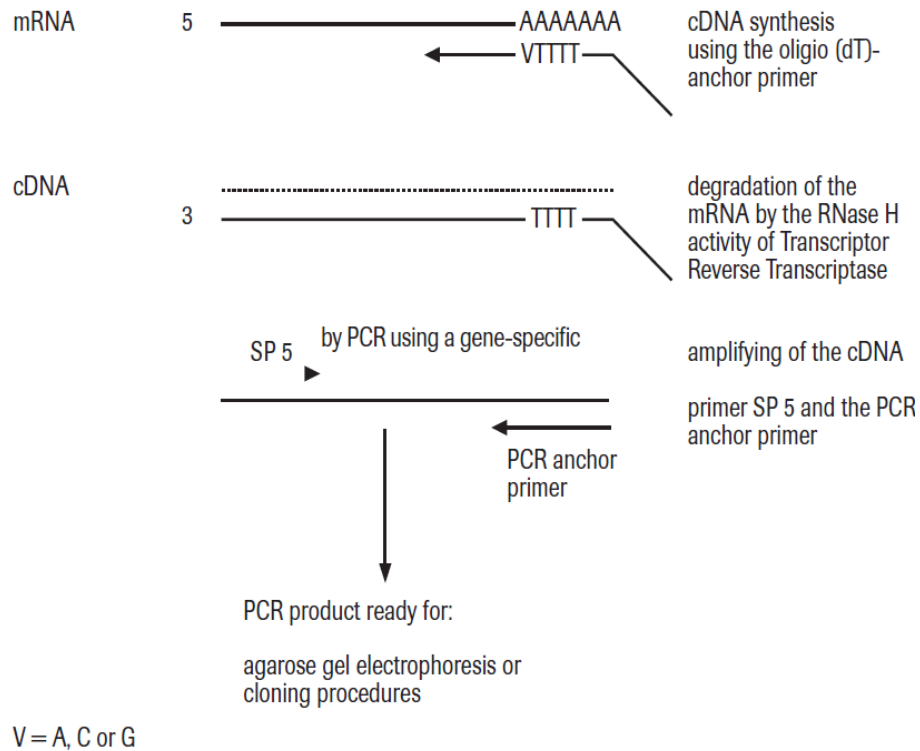


Figura 3.2 – Representação esquemática da amplificação da extremidade 3', utilizando a técnica RACE (retirado do kit 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation, Roche).

Realizou-se a amplificação rápida das extremidades do cDNA (RACE) seguindo o protocolo do kit 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche) e utilizaram-se os primers específicos, que se encontram na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Primers específicos utilizados para o RACE da MDH e da Vac H⁺ ATPase.

	<i>MDH</i>	<i>Vac H⁺ ATPase</i>	
SP1	5' CACTGACTTGACATTTAGCC 3'	5' CCCACGATAAGGCCATAAAGT 3'	5' RACE
SP2	5' GTGATCCAACCGTGTCAAGC 3'	5' CAAGACCGCAAGCAAGACCC 3'	
SP3	5' CCTTGGAACCCACCAACCA 3'	5' ACACACCGGCCATAACGACTG 3'	
SP5	5'GTTGAGGCATGCACTGGTG 3'	5' AGGCCTGAGCTCGTGATGAA 3'	3' RACE
SPn	5' CATGCTTGACACGGTTGGATC 3'	-	

Os componentes e as condições utilizadas no PCRs para a primeira amplificação da extremidade 5' RACE foram: 34,3 µL de água mQ; 0,5 µL de uma mistura de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's) com uma concentração de 10 mM; 3 µL de MgCl₂ com uma concentração de 25 mM; 5 µL tampão de reacção de PCR (10x) com (NH₄)₂SO₄ (Fermentas); 0,2 µL de *Taq* polimerase (5 U/ µL) (Fermentas); 1 µL do vial 8

(primer oligo dT-adaptador); 1 μL de SP2 (MDH 5'¹ ou Vac 5'²) com uma concentração de 12,5 μM ; 5 μL cDNA 5' com cauda de poliadeninas, num volume final de 50 μL . Introduziram-se os tubos num termociclador e estes foram submetidos às condições descritas nas tabelas 3.3 e 3.4.

Tabela 3.3 - Condições utilizadas no PCR para a primeira amplificação do MDH 5'.

	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94 °C	2 min	1
Desnaturação inicial	94 °C	30 s	35
Emparelhamento	59 °C	30 s	
Extensão	72 °C	60 s	
Extensão final	72 °C	7 min	1

Tabela 3.4 - Condições utilizadas no PCR para a primeira amplificação do Vac 5'.

	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94 °C	2 min	1
Desnaturação inicial	94 °C	30 s	35
Emparelhamento	64 °C	30 s	
Extensão	72 °C	30 s	
Extensão final	72 °C	7 min	1

Para a segunda amplificação da 5' RACE foram utilizadas as seguintes condições: 37,5 μL de água mQ; 1 μL de uma mistura de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's) com uma concentração de 10 mM; 3 μL de MgCl_2 com uma concentração de 25 mM; 5 μL tampão de reacção de PCR (10x) com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Roche); 0,5 μL de Expand High Fidelity (3,5 U/ μL) (Roche); 1 μL do vial 9 (primer adaptador); 1 μL de SP3 (MDH 5' ou Vac 5') com uma concentração de 12,5 μM ; 1 μL produto do PCR da primeira amplificação diluído (1:20), num volume final de 50 μL . Introduziram-se os tubos num termociclador e estes foram submetidos às condições descritas nas tabelas 3.5 e 3.6.

¹ Fragmento de DNA proveniente da amplificação da extremidade 5' da malato desidrogenase.

² Fragmento de DNA proveniente da amplificação da extremidade 5' da H^+ ATPase vacuolar.

Tabela 3.5 - Condições utilizadas no PCR para a segunda amplificação do MDH 5'.

	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94 °C	2 min	1
Desnaturação inicial	94 °C	30 s	35
Emparelhamento	62 °C	30 s	
Extensão	72 °C	30 s	
Extensão final	72 °C	7 min	1

Tabela 3.6 - Condições utilizadas no PCR para a segunda amplificação do Vac 5'.

	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94 °C	2 min	1
Desnaturação inicial	94 °C	30 s	35
Emparelhamento	64 °C	30 s	
Extensão	72 °C	30 s	
Extensão final	72 °C	7 min	1

Na amplificação da extremidade 3' RACE utilizaram-se os seguintes componentes para a reacção: 35,5 µL de água mQ; 1 µL de uma mistura de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's) com uma concentração de 10 mM; 5 µL de MgCl₂ com uma concentração de 25 mM, 5 µL tampão de reacção de PCR (10x) com (NH₄)₂SO₄ (Roche); 0,5 µL de Expand High Fidelity (3,5 U/ µL) (Roche); 1 µL do vial 9 (primer adaptador); 1 µL de SP5 (MDH 3'³ ou Vac 3'⁴) com uma concentração de 12,5 µM; 1 µL cDNA 3', num volume final de 50 µL. Introduziram-se os tubos num termociclador e estes foram submetidos às condições descritas na tabela 3.7 e 3.8.

Tabela 3.7 - Condições utilizadas no PCR para a primeira amplificação do MDH 3'.

	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94 °C	2 min	1
Desnaturação inicial	94 °C	30 s	35
Emparelhamento	58 °C	90 s	
Extensão	72 °C	2 min	
Extensão final	72 °C	7 min	1

³ Fragmento de DNA proveniente da amplificação da extremidade 3' da malato desidrogenase.

⁴ Fragmento de DNA proveniente da amplificação da extremidade 3' da H⁺ ATPase vacuolar.

Tabela 3.8 - Condições utilizadas no PCR para a amplificação do Vac 3'.

	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94 °C	2 min	1
Desnaturação inicial	94 °C	30 s	35
Emparelhamento	56 °C	30 s	
Extensão	72 °C	90 s	
Extensão final	72 °C	7 min	1

Foi necessário realizar uma segunda amplificação da extremidade 3' RACE para a MDH, para tal utilizaram-se os seguintes componentes: 35,5 µL de água mQ; 1 µL de uma mistura de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's) com uma concentração de 10 mM; 5 µL de MgCl₂ com uma concentração de 25 mM, 5 µL tampão de reacção de PCR (10x) com (NH₄)₂SO₄ (Roche); 0,5 µL de Expand High Fidelity (3,5 U/ µL) (Roche); 1 µL do vial 9 (primer adaptador); 1 µL de SPn com uma concentração de 12,5 µM; 1 µL produto do PCR da primeira amplificação diluído (1:20), num volume final de 50 µL. Introduziu-se o tubo num termociclador e foi submetido às condições descritas na tabela 3.9.

Tabela 3.9 - Condições utilizadas no PCR para a segunda amplificação na MDH 3'.

	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94 °C	2 min	1
Desnaturação inicial	94 °C	30 s	35
Emparelhamento	58 °C	30 s	
Extensão	72 °C	90 s	
Extensão final	72 °C	7 min	1

Após estas amplificações, os fragmentos de cDNA foram purificados e extraídos de um gel de agarose a 1,5% com o auxílio do kit QIAquick® Spin Handbook (QIAquick), protocolo QIAquick Gel Extraction Kit Protocol. Após a extracção procedeu-se a uma electroforese em gel de agarose de forma a confirmar a correcta purificação dos fragmentos pretendidos. De seguida procedeu-se à clonagem desses fragmentos.

3.4. Electroforese em gel de agarose

Os produtos do PCR do RACE foram submetidos a uma electroforese, em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL), em tampão TAE 1x (0,04 Tris-acetato, 0,001 EDTA) num aparelho de electroforese Horizon 11.14 (Invitrogene) durante vinte e cinco minutos a 98V. Antes da electroforese adicionou-se 2 µL de tampão de amostra a 10 µL da amostra. Utilizou-se um marcador de peso molecular de 100 pb ladder (Invitrogen), nas electroforeses com os produtos RACE e DNA genómico lambda (λ) para a extracção dos plasmídeos recombinantes. Os géis foram visualizados num transiluminador de UV e fotografador.

3.5. Clonagem

Procedeu-se à inserção dos fragmentos obtidos por PCR no vector pJET1.2/blunt utilizando o kit CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas). De seguida utilizando células competentes de *E. coli* da estirpe DH5α, procedeu-se à clonagem dos vectores com os fragmentos de cDNA da MDH e Vac H⁺ ATPase, através da utilização do kit TransformAid™ Bacterial Transformation Kit (Fermentas).

Após a incubação durante a noite a 37 °C procedeu-se ao isolamento e confirmação das colónias transformadas. Esta confirmação foi efectuada através da realização de um PCR. Os componentes necessários para se proceder ao PCR foram: 13,9 µL de água mQ; 2 µL de uma mistura de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's) com uma concentração de 2 mM; 1,2 µL de MgCl₂ com uma concentração de 25 mM; 2 µL tampão de reacção de PCR (10x); 0,1 µL de *Taq* Polimerase (5 U/ µL) (Fermentas); 1 µL de pJET 1.2 F com uma concentração de 10 µM; 1 µL de pJET 1.2 R com uma concentração de 10 µM, num volume final de 20 µL. Introduziram-se os tubos num termociclador e estes foram submetidos às condições descritas na tabela 3.10. Depois da reacção do PCR terminar, analisaram-se os produtos procedendo-se a uma electroforese em gel de agarose a 1% e visualizou-se o gel num transiluminador de UV. Simultaneamente, procedeu-se a uma nova incubação das colónias desejadas através de um riscado numa placa de Petri contendo meio LB com ampicilina.

Tabela 3.10 - Condições utilizadas para o PCR de confirmação da clonagem.

	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturação inicial	94 °C	30 s	35
Emparelhamento	60 °C	30 s	
Extensão	72 °C	1min	

Após a verificação da correcta inserção dos fragmentos, procedeu-se à extracção do plasmídeo recombinante das células clonadas. Para tal utilizou-se o procedimento descrito no kit Gene JET™ Plamid Miniprep (Fermentas).

3.6. Sequenciação

Após a extracção dos plasmídeos recombinantes, procedeu-se a uma diluição do DNA para uma concentração de 100 ng / μ L, e foram enviadas as amostras para a MacroGen, uma empresa especializada que realizou o processo de sequenciação das amostras.

4. Resultados e Discussão

4.1. Optimização do RACE

Foi necessário realizar várias reacções de RACE até conseguir encontrar as condições ideais. Como tal utilizaram-se diversas concentrações de magnésio (Mg^{2+}), até encontrar a concentração ideal. Se a concentração de Mg^{2+} fosse demasiado baixa, influenciaria o rendimento do PCR, formando menos produtos. Mas se existir uma elevada concentração de Mg^{2+} podem ocorrer produtos de PCR não específicos.

No caso das amplificações 5' RACE a concentração do $MgCl_2$ foi de 1,5 mM, enquanto para a 3' RACE foi de 2,5 mM.

Outro factor tido em consideração foi a temperatura de emparelhamento (T_a), que levou à utilização de várias temperaturas diferentes. Esta temperatura vai depender das temperaturas de fusão (T_m) dos primers utilizados, tanto os primers específicos como os primers adaptador e oligo dT-adaptador. Estas temperaturas encontram-se na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Temperaturas de fusão empíricas para os primers utilizados durante o RACE.

pr	MDH	Vac H ⁺ ATPase
oligo dT-adaptador (vial 8)	102 °C	
adaptador (vial 9)	70 °C	
SP1	62 °C	62 °C
SP2	52 °C	57 °C
SP3	59 °C	57 °C
SP5	55 °C	62 °C
SPn	64 °C	-

Para a MDH 3' realizou-se um PCR adicional, pois o fragmento com a SP5 era bastante grande e este facto poderia influenciar a qualidade da sequenciação. Por esta razão realizou-se um nested PCR utilizando o SPn.

Após a realização dos RACE's contactou-se que a MDH 5' apresentava um fragmento com cerca de 600 pb, na primeira amplificação e 500 pb na segunda amplificação. Isto pode ser comprovado com a figura 4.1. Já a MDH 3' apresentou um fragmento com aproximadamente 1000 pb para a primeira amplificação e 800 pb na segunda amplificação, como é demonstrado na figura 4.2.

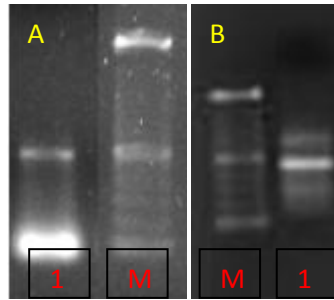


Figura 4.1 – Amplificação da MDH 5' A- primeira amplificação, 1 - fragmento de 600 pb e o marcador de 100 pb. B - segunda amplificação, 1 - 500 pb e o marcador de 100 pb.

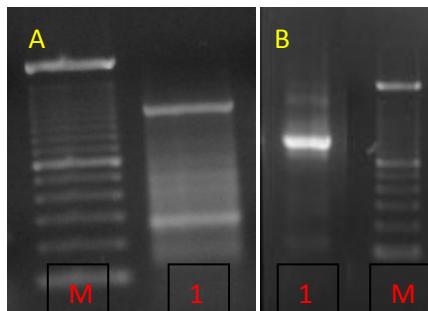


Figura 4.2 – Amplificação da MDH 3' A- primeira amplificação, 1 - fragmento de 1000 pb e o marcador de 100 pb. B - segunda amplificação, 1 - fragmento de 800 pb e o marcador de 100 pb.

Para a Vac 5' o fragmento tinha entre 200 e 300 pb, na primeira amplificação e 100 e 200 pb na segunda amplificação. Isto pode ser observado na figura 4.3. No caso da Vac 3', o fragmento apresentava um comprimento de 700 pb, sendo isso é evidenciado na figura 4.4, embora a banda seja muito tênue.

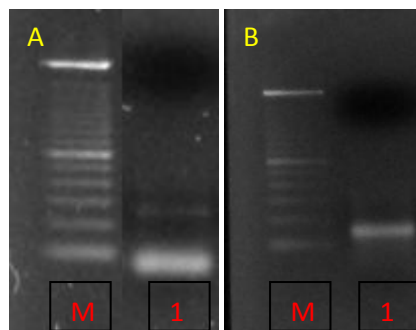


Figura 4.3 – Amplificação da Vac 5'. A- primeira amplificação, 1 - fragmento entre 200 e 300 pb e marcador de 100 pb. B - segunda amplificação, 1 - fragmento entre 100 e 200 pb e marcador de 100 pb.

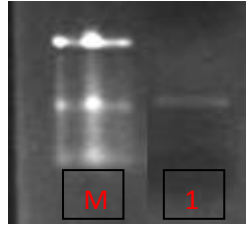


Figura 4.4 – Amplificação da Vac 3', 1 - fragmento de 700 pb e o marcador de 100 pb.

Realizou-se a purificação e extracção dos produtos obtidos por RACE, num gel de agarose, para a MDH 3', MDH 5' e Vac 3'. Foi necessária esta purificação porque as bandas que se encontraram não apareciam bem definidas no gel, mas sim um pouco esborratadas.

4.2. Clonagem

Realizou-se a inversão dos fragmentos no vector pJET1.2/blunt, seguindo-se a clonagem nas células competentes. De seguida semearam-se as células competentes em placas de Petri, obtendo-se 4 placas (MDH 3', MDH 5', Vac 3' e Vac 5'). Estas placas foram incubadas durante a noite a 37 °C. No dia seguinte procedeu-se ao isolamento de algumas colónias das placas iniciais, numa nova placa.

Após o processo de incubação das células DH5 α , durante uma noite, verificou-se o aparecimento de contaminantes nas placas de Petri. Este aparecimento ocorreu mesmo utilizando todas as precauções exigidas, ou seja, utilizou-se somente material esterilizado e ligou-se a luz ultra-violeta 20 min antes da sua utilização.

Por causa dos contaminantes não foi possível utilizar as colónias da placa de Petri com os fragmentos da Vac 3', na primeira tentativa de clonagem. Contudo foi possível isolar os fragmentos da MDH 3', da MDH 5' e da Vac 5', numa nova placa de Petri. Nas figuras 4.5, 4.6 e 4.7 encontram-se o esquema da placa de Petri onde foram isoladas algumas colónias dos fragmentos desejados e a fotografia dos géis dos PCRs onde foram confirmados a correcta clonagem dos fragmentos desejados.

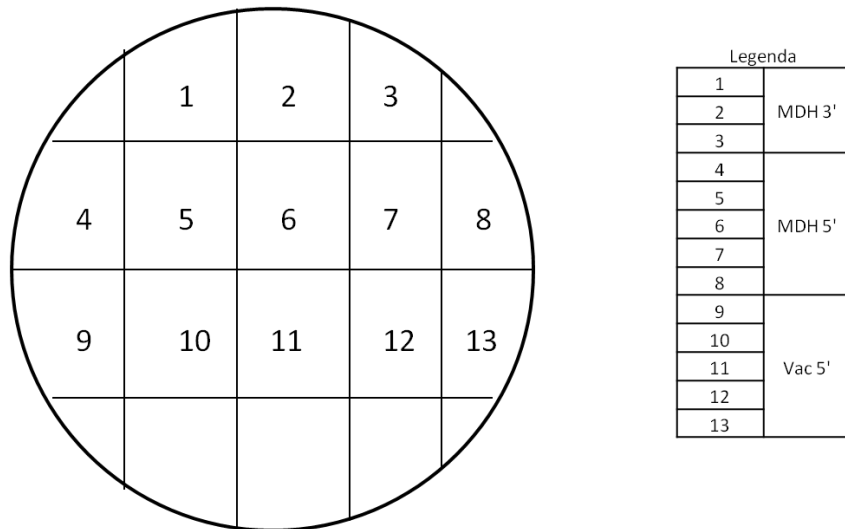


Figura 4.5 – Esquema da placa de Petri onde foram isoladas as colónias para a MDH 3', MDH 5' e Vac 5'.

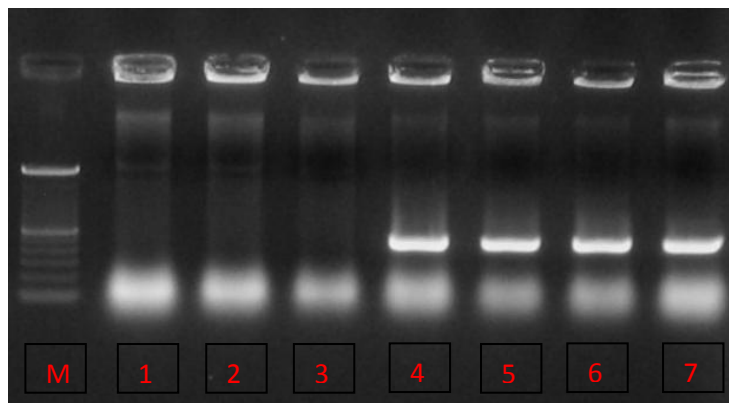


Figura 4.6 – PCR de confirmação da correcta inserção e clonagem dos fragmentos. Com marcador de 100 pb, de 1-3 – MDH 3' e de 4-7 – MDH 5'.

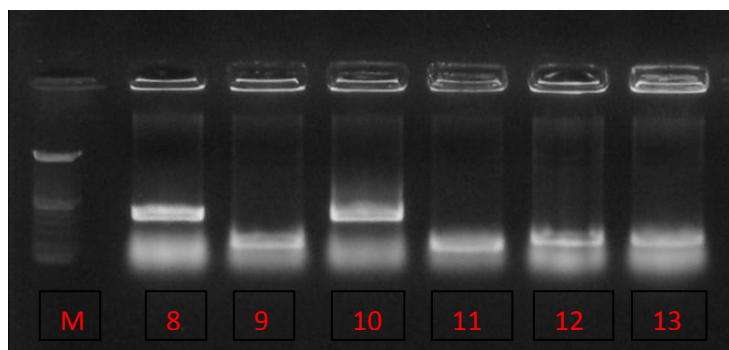


Figura 4.7 – PCR de confirmação da correcta inserção e clonagem dos fragmentos. Com marcador de 100 pb, de 8 – MDH 5' e de 9-13 – Vac 5'.

Verificou-se através da análise do gel, que para a MDH 5' e Vac 5' a clonagem e isolamento tinham sido efectuadas com sucesso. Mas na MDH 3' não existiu a inserção correta do fragmento no vector. Por esta razão realizou-se uma segunda clonagem para a MDH 3'. Para a Vac 3' também foi necessário proceder-se a uma nova clonagem.

Na segunda tentativa de clonagem, redobraram-se os cuidados para evitar contaminantes, sendo que todo o material utilizado foi esterilizado no dia anterior. O facto de a contaminação ter permanecido pode indicar que os contaminantes eram provenientes das células DH5 α . Os resultados para a segunda tentativa de isolamento dos fragmentos da MDH 3' e Vac 3' encontram-se nas imagens 4.8 e 4.9.

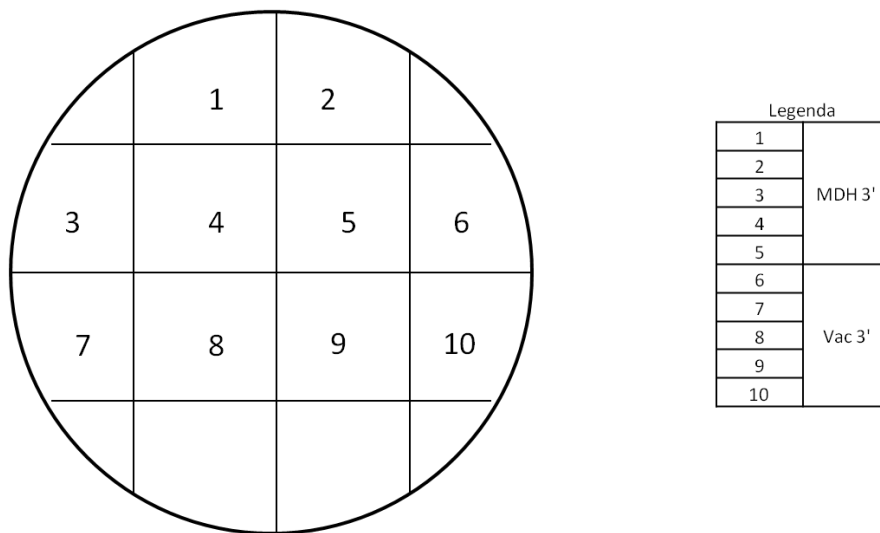


Figura 4.8 – Esquema da placa de Petri onde foram isoladas as colónias para a MDH 3' e Vac 3', segunda tentativa.

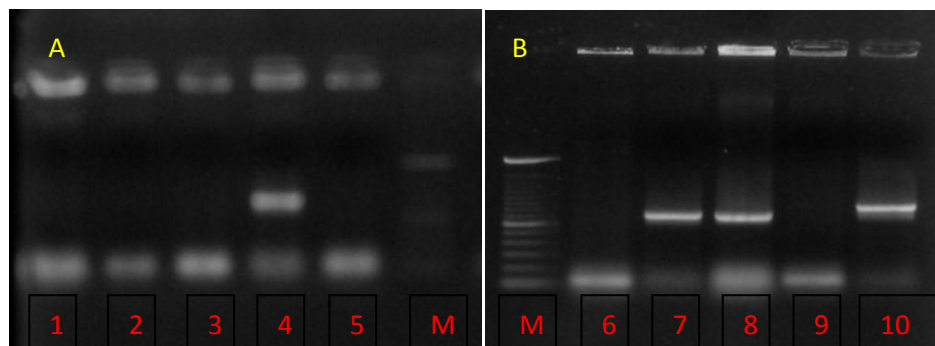


Figura 4.9 – PCR de confirmação da correcta inserção e clonagem dos fragmentos, segunda tentativa. A- MDH 3'; B- Vac 3'.

Foi necessário proceder-se a uma nova clonagem para a MDH 3', pois só apresentava uma colónia com o fragmento de 800 pb.

Também foi necessário proceder a uma novo isolamento para a Vac 3', pois a placa de Petri onde foram isoladas as células que apresentavam os fragmentos ficou muito contaminada. Por esta razão, não foi possível realizar a extracção dos plasmídeos.

A nova tentativa de isolamento foi realizada utilizando 2 colónias diferentes tanto para a MDH 3', como para a Vac 3', pois eram as únicas colónias da placa original que ainda se encontravam em condições. O esquema da placa de isolamento e o resultado do PCR de confirmação encontram-se nas figuras 4.10 e 4.11.

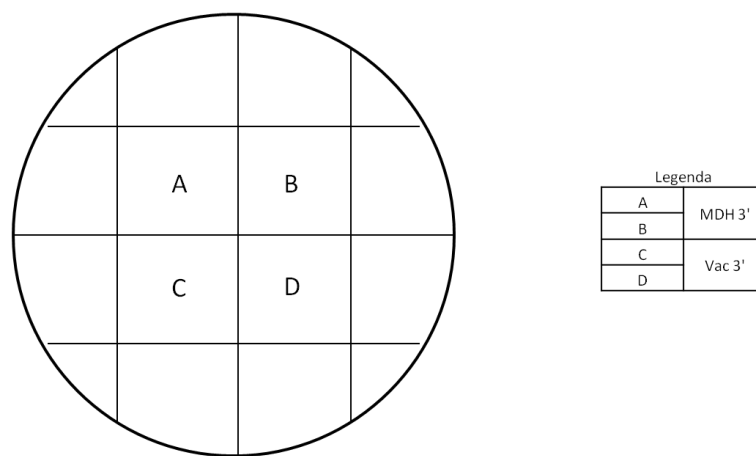


Figura 4.10 – Esquema da placa de Petri onde foram isoladas as colónias para a MDH 3' e Vac 3', terceira tentativa.

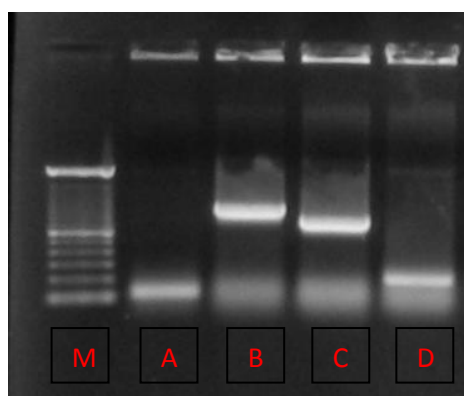


Figura 4.11 – PCR de confirmação da correcta inserção e clonagem dos fragmentos, segunda tentativa. A e B - MDH 3' e C e D – Vac 3'.

Após a análise do gel, observa-se que foi possível obter para a MDH 3' o fragmento de 800 pb na colónia B, já para a Vac 3' a colónia C apresentou uma correcta clonagem do fragmento de 700 pb.

Com todas a extremidades correctamente clonadas foi possível proceder-se à extracção dos respectivos plasmídeos recombinantes. O resultado da confirmação da extracção está na figura 4.12. Pela análise do gel constata-se que a extracção do vector para a Vac 5' não foi bem-sucedida. Por este motivo foi necessário realizar uma nova extracção. Utilizou-se o mesmo procedimento, mas foram utilizadas colónias isoladas diferentes. Na figura 4.13 encontra-se o resultado da confirmação da extracção para a Vac 5'.

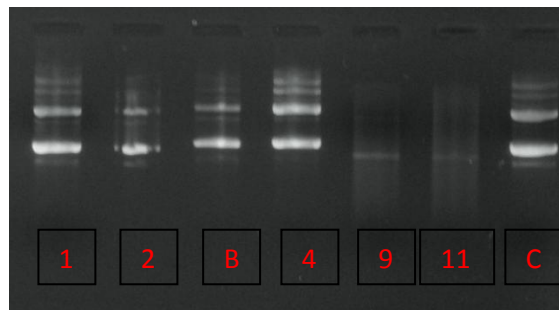


Figura 4.12 – PCR de confirmação da correcta extracção dos plasmídeos recombinantes. 1 e 2 - MDH 3', B e 4 – MDH5', 9 e 11 – Vac 5' e C – Vac 3'.

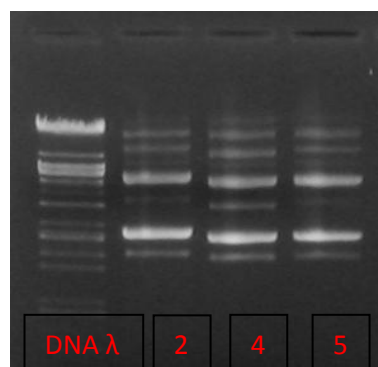


Figura 4.13 – PCR de confirmação da correcta extracção dos plasmídeos recombinantes, segunda extracção para a Vac 5'.

Com todos os vectores correctamente extraídos procedeu-se à diluição da mistura dos plasmídeos recombinantes para 100 ng / μ L.

4.3. Sequenciação

A sequenciação foi realizada pela empresa MacroGen, tendo sido enviados dois clones de MDH 5' e de MDH 3'. Contudo para a Vac 5' foram enviados 3 clones, pois uma das colónias apresentava um fragmento que continha mais pares de bases do que os esperados (aproximadamente 500 pb). No caso da Vac 3', apenas uma colónia se apresentava em boas condições, pelo que se procedeu à sequenciação no sentido forward e no sentido reverse.

Após a entrega dos resultados da sequenciação foi necessário, em primeiro lugar, encontrar as sequências laterais ao local de clonagem do vector. Depois identificou-se os primers utilizados para cada clone dentro da sequência nucleotídica que se encontrava entre as sequências laterais ao local de clonagem do vector.

De seguida conferiram-se os cromatogramas, de modo a confirmar que a sequência nucleotídica não apresentava erros. Este passo de confirmação foi extremamente importante, pois existiam alguns picos nos cromatogramas que não estavam bem definidos. Estes picos mal definidos causam erros na sequência nucleotídica através da troca de um nucleótido por outro.

No clone de Vac 5' que apresentava cerca de 500 pb após a análise da sequência verificou-se que durante a clonagem ocorreu uma duplicação genética.

Depois procedeu-se ao alinhamento dos dois clones de cada extremidade, por exemplo, para a MDH 5' alinharam-se os dois clones e verificou-se que, como era esperado, que o seu alinhamento era perfeito. No caso em que o alinhamento apresentava algum nucleótido mal alinhado, observou-se novamente o cromatograma para verificar se existia algum nucleótido indevidamente identificado.

Já com as sequências conferidas e livres de erros procedeu-se ao alinhamento da extremidade 5' RACE com a extremidade 3' RACE e com o DNA molde, obtendo-se assim a sequência de cDNA completa.

4.4. Análise das sequências de cDNA

O primeiro passo para analisar as sequências nucleotídicas foi realizar um Blast na base de dados NCBI (The National Center for Biotechnology Information), para confirmar se os fragmentos obtidos apresentavam homologias com as enzimas em estudo.

Depois identificaram-se as regiões 5' UTR, ORF e 3' UTR e se existem sinais de poliadenilação na sequência.

Utilizou-se o programa BLAST da base de dados NCBI para encontrar as espécies que apresentavam uma maior similaridade com as sequências das enzimas MDH e Vac H⁺ ATPase sequenciadas. Também colocou-se a sequência nucleótida da ORF no programa Search for Conserved Domain da NCBI, de forma a confirmar se as sequências apresentavam os domínios das enzimas em estudo.

4.4.1. Análise da MDH

A sequência de NAD-MDH citosólica sequenciada apresenta 1364 nucleótidos, com um ORF de 996 nucleótidos, que codifica uma proteína com 332 aminoácidos. Também contém uma zona 5' UTR com 84 nucleótidos e uma zona 3' UTR com 284 nucleótidos. NA 3' UTR encontra-se o codão de terminação, que é a sequência TAA, um sinal de poliadenilação (AATAAA) e uma cauda de adeninas com 15 nucleótidos. Isto pode ser observado na figura 4.14.

A sequência da NAD-MDH citosólica foi caracterizada para o trigo, obtendo também o mesmo sinal de poliadenilação. Na ORF também foi localizado o sítio activo da enzima e também o local de ligação ao co-factor NAD, tendo por base as sequências conservadas destes locais [77].

De seguida procedeu-se ao Blast no NCBI, analisando os resultados verifica-se que esta sequência apresenta muita similaridade com as sequências que codificam para a MDH citosólica nas espécies *Corylus heterophylla* (JF428130.1), *Populus trichocarpa* (XM_002332708.1), *Lupinus angustifolius* (HQ690187.1) e *Catharanthus roseus* (HQ380175.1).

Efectou-se um alinhamento múltiplo utilizando a sequência amplificada por RACE na *Annona cherimola* e as espécies descritas anteriormente. Este alinhamento foi realizado utilizando o programa TCOFFEE disponível na base de dados ExPASy, os resultados deste alinhamento encontram-se nos Anexos. Observou-se que existe uma grande quantidade de nucleótidos conservados.

```

1  GCCACAGCTGCGTTTTCTGCTCTCGTCTTTTCCCTCCCTTTGTAGGGTTTTGATTCC
1  M A K E P V R V L V T G
61  GCGAACTCTCTTCATCCTCCATCAATGGCGAAAGAACCAGTTCGAGTTCTCGTTACAGGA
13  A A G Q I G Y A L V P M I A R G V M L G
121 GCGCTGGACAAATTGGGTATGCTCTTGTTCCAATGATTGCAAGAGGTGTGATGCTGGGT
33  P D Q P V I L H M L D I A P A A E A L N
181 CCTGACCAGCCTGTAATTTTACACATGCTTGACATTGCACCAGCTGCTGAGGCCCTGAAT
53  G V K M E L V D A A F P L L K G V V A T
241 GGAGTAAAAATGGAGTTGGTTGATGCTGCATTTCCCTCTTCTTAAAGGTGTGGTTGCTACA
73  T D V V E A C T G V N I A V M V G G F P
301 ACTGACGTTGTTGAGGCATGCACTGGTGTCAATATTGCTGTTATGGTTGGTGGGTTCCCA
93  R K E G M E R K D V M S K N V S I Y K S
361 AGGAAAGAAGGTATGAAAAGAAAAGATGTGATGTCCAAAATGTCTCTATCTACAAGTCT
113 Q A S A L E K H A A A N C K V L V V A N
421 CAGGCATCTGCATTAGAGAAGCATGCAGCTGCAAACTGCAAGTTCTTGTGTGCTAAT
133 P A N T N A L I L K E F A P S I P E K N
481 CCAGCTAACACTAATGCATTGATTTTGAAAGAGTTTGCTCCATCCATTCCTGAGAAAAAT
153 I T C L T R L D H N R A L G Q I S E R L
541 ATAACATGCTTGACACGGTTGGATCACAATAGGGCACTTGGTCAGATCTCAGAGAGGCTA
173 N V Q V S D V K N V I I W G N H S S T Q
601 AATGTGCAAGTCAGTGATGTGAAAAATGTTATCATTTGGGGAAATCATCTTCAACACAG
193 Y P D V N H A T L K T P N G E K S V K E
661 TATCCTGATGTCAACCATGCCACTCTCAAAACACCCAATGGCGAAAAGTCTGTTAAGGAG
213 L I A D D E W L K G E F I T T V Q Q R G
721 CTCATTGCTGATGATGAATGGTTGAAAGGAGAATTCATTACAACGTCCAACAACGAGGT
233 A A I I K A R K L S S A L S A A S S A C
781 GCTGCAATAATAAAGGCACGTAAGCTCTCAAGTGCTTTGTCTGCTGCAAGTTCTGCTTGC
253 D H I R D W V L G T P E G T W V S M G V
841 GACCATATTCGTGATTGGGTGCTGGGAACCCCTGAGGGCACTTGGGTCTCCATGGGTGTG
273 Y S D G S Y N V P A G L I Y S F P V T C
901 TACTCTGATGGTTCTTACAATGTACCTGCTGGACTAATATATTCTTTCCAGTCACATGC
293 C S G E W T I V Q G L S I D E F S R N K
961 TGCAGTGGAGAATGGACTATCGTCCAAGGACTTTCAATTGATGAATTTTCGAGGAATAAA
313 L D A T A A E L T E E K A L A Y S C L S
1021 CTGGATGCAACTGCAGCGGAGCTGACCGAGGAAAAGGCCTTAGCTTATTCATGCCTTTCT
333 *
1081 TAAACTCCCATACCATTTGGCCACTATGCCCGAGTGAATTTTCATGCATACAAGGTACAG

1141 AGATCTATGGTTTCCAAATATAAGCTATCGACTTGTCTGGATAGCCGTGGAGGAGCCTTC
1201 ATGCTCATCTTTGTCAATCTGTGCTGATTTTATTCTCGTATCTTTTTACCTATGGCCAC
1261 TTTACATAGGAGATTTTGTGTTTGGACGTTTTTGAACCTTTATTGCCTATGAAGTTATACTA
1321 AGACCACTTATATGGGAGGTTTTGTTTTGAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 4.14 – Sequência nucleotídica de cDNA e sequência aminoacídica deduzida para a NAD-MDH citosólica da *Annona cherimola*. As letras a azul representam aminoácidos, os codões de iniciação e terminação estão sublinhados e o sinal de poliadenilação está realçado com a cor cinzenta, os nucleótidos que estão a vermelho são os que codificam o sítio activo da enzima e os nucleótidos que estão a verde codificam os aminoácidos que se ligam ao NAD.

Para confirmar que realmente foi amplificada a MDH citosólica procedeu-se à análise da ORF, de forma a encontrar os domínios, para tal utilizou-se o programa Search for Conserved Domain da NCBI. Após a análise dos resultados verificou-se que, como esperado, a ORF da sequência amplificada apresenta os domínios da MDH citosólica. Este resultado pode ser comprovado pela observação da figura 4.15. Como tal podemos inferir que concretizou-se o objectivo de amplificar a MDH citosólica da *Annona cherimola*.

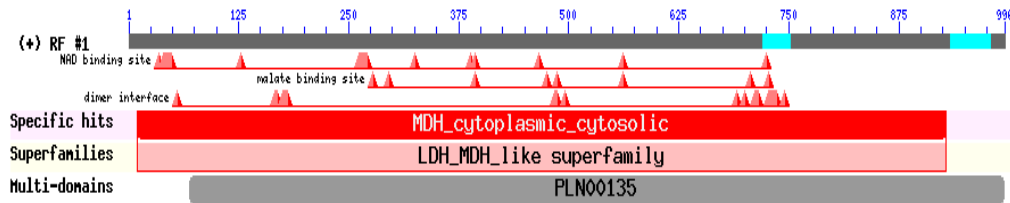


Figura 4.15 – Resultado da colocação da ORF da MDH da *Annona cherimola* no programa Search for Conserved Domain da NCBI.

Yao [54] observou que para a maçã o gene da MDH citosólica era expresso constitutivamente nas raízes, caules e folhas. Ding [77] caracterizou a NAD-MDH citosólica para o trigo. Verificando através de uma análise por Northern Blot, que existia mRNA nas folhas, caules e raízes. Por isso, na *Annona cherimola* o gene da MDH também deve ser expresso constitutivamente em vários tecidos celulares diferentes.

A ORF da sequência de cDNA da *Annona cherimola* codifica uma proteína com um ponto isoeléctrico de 5,92 e uma massa molecular de 35535,92. Estes valores foram calculados utilizando o programa Compute pI/Mw, que está localizado na base de dados ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/). Os valores obtidos são da mesma ordem de grandeza da NAD-MDH citosólica do trigo. No caso do trigo, a enzima NAD-MDH apresenta um ponto isoeléctrico de 5,9 e uma massa molecular relativa de 35500 [77].

4.4.2. Análise da Vac H⁺ ATPase.

A sequência de cDNA para a Vac H⁺ ATPase contém 799 nucleótidos, dos quais 498 nucleótidos fazem parte do ORF, codificando uma proteína com 166 aminoácidos. Também apresenta uma zona 5' UTR com 36 nucleótidos e uma zona 3' UTR com 265

nucleótidos. O codão de terminação é a sequência TGA e contem uma cauda de adeninas com 15 nucleótidos. Isto pode ser verificado na figura 4.16.

Apesar de existir uma cauda de adeninas não foi possível encontrar um sinal de poliadenilação. Foram analisadas várias sequências que habitualmente são consideradas sinais de poliadenilação. Como por exemplo, AATAAA [78], AATGAA [79], AATAAT [80], AATGAT [81] e ATTAATAAT [82].

Com o Blast realizado no NCBI verificou-se que a sequência amplificada para a *Annona cherimola* da Vac H⁺ ATPase apresentava maior similaridade com a subunidade C. Com muitos clones de *Vitis vinifera*.

Efectou-se um alinhamento múltiplo utilizando a sequência amplificada por RACE na *Annona cherimola* e as espécies *M. crystallinum* (X94999.1), *Ricinus communis* (XM_002510440.1), *Plantago major* (AM111326.1) e *Popullus trichocarpa* (XM_002307663.1). Este alinhamento foi realizado utilizando o programa TCOFFEE disponível na base de dados ExPASy, os resultados deste alinhamento encontram-se nos Anexos. Observou-se que existe uma grande quantidade de nucleótidos conservados.

```

1                               M S S A G F S S
1 CTCTATTTTCGATTCCCTTCAAACCTAATCCCGCAGAAATGTCCTTCTGCTGGCTTCAGCAGC
8 D E T A P F F G F L G A A A A L V F S C
61 GATGAAACTGCTCCGTTCTTCGGATTCCCTTGGCGCTGCTGCTGCCCTCGTCTTCTCCTGC
28 M G A A Y G T A K S G V G V A S M G V M
121 ATGGGGGCTGCGTACGGGACTGCCAAGAGCGGGTTCGGTGTGCTCCATGGGAGTTATG
48 R P E L V M K S I V P V V M A G V L G I
181 AGCCCTGAGCTCGTGATGAAGTCAATCGTCCCAGTCGTTATGGCCGGTGTGTTAGGTATT
68 Y G L I I A V I I S T G I N P R A K S Y
241 TATGGTTTGATCATAGCTGTGATTATCAGTACTGGAATTAATCCTAGGGCGAAGTCCTAC
88 Y L F D G Y A H L S S G L A C G L A G L
301 TATCTCTTTGATGGGTATGCCACCTCTCGTCCGGTCTTGCTTGCAGTCTTGCTGGGCTG
108 S A G M A I G I V G D A G V R A N A Q Q
361 TCTGCTGGAATGGCAATTGGAATCGTCCGAGATGCTGGCGTTAGAGCCAATGCTCAGCAG
128 P K L F V G M I L I L I F A E A L A L Y
421 CCAAACTTTTTGTTGGGATGATCCTCATTCTCATCTTTGCTGAAGCACTGGCACTTTAT
148 G L I V G I I L L F R A G Q S R A D *
481 GGCCTTATCGTGGGCATCATCTTACTATTCCGAGCTGGTCAATCTCGGGCAGACTGAGAA
541 ATCACGCCTCAAGGCATTTTGGGAACGCTTTGTGTGCCTGCATAGAACATTGATTGTAAC
601 CGAATTAGCTGCTACTATGTTTATGATGGTTCAAGGAGCTGCTCTCTGTGGAGTTCCTTG
661 AGATTTTATTTCCCTTCTCTTTCCACAACAGTTGCGCTCAATTTCTTCTTCGGCATC
721 TCTCCATTGGAGAGATGTTATGAACAATGTAAGCTCGTATATGGAGTATCTATATTCCTT
781 GCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 4.16 – Sequência nucleotídica de cDNA e sequência aminoacídica deduzida para a Vac H⁺ ATPase da *Annona cherimola*. As letras a azul representam aminoácidos, os codões de iniciação e terminação estão sublinhados.

Depois analisou-se a ORF, encontrando os domínios, para tal utilizou-se o programa Search for Conserved Domain da NCBI. Após a análise dos resultados verificou-se que o ORF da sequência amplificada apresenta os domínios para a família das ATPases, este resultado pode ser comprovado pela observação da figura 4.17. Como tal podemos inferir que concretizou-se o objectivo de amplificar a Vac H⁺ ATPase da *Annona cherimola*, neste caso foi amplificada o cDNA da subunidade C.

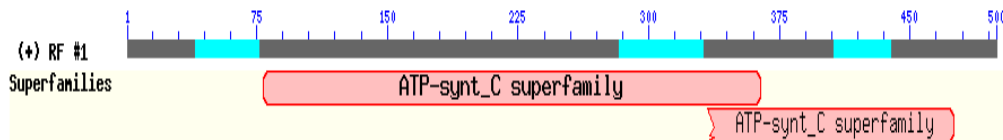


Figura 4.17 – Resultado da colocação da ORF da Vac H⁺ ATPase da *Annona cherimola* no programa Search for Conserved Domain da NCBI.

Foram calculados o ponto isoelétrico e a massa molecular relativa utilizando o programa Compute pI/Mw, da ExPASy. Verificou-se que a subunidade C da Vac H⁺ ATPase apresenta um ponto isoelétrico de 9,58 e uma massa molecular de 12233,79.

A subunidade C da Vac H⁺ ATPase tem uma função importante na inibição da actividade desta enzima. Já que se verificou através de estudos, utilizando a microscopia electrónica, que esta subunidade é essencial para a nova montagem dos complexos V₁ e V₀, após o seu dissociamento [83], [84].

A glucose estimula a actividade da Vac H⁺ ATPase, quando existe pouca glucose é induzida a dissociação dos domínios V₁ e V₀. A subunidade C é a única que consegue sair reversivelmente da enzima após a diminuição da glucose, isso leva à separação do domínio V₁ do domínio V₀. Por outro lado, a subunidade C consegue detectar mudanças na concentração de ATP e induzir a regulação da dissociação da enzima [83], [84].

Para a subunidade C da Vac H⁺ ATPase da cevada (*Hordeum vulgare*), os transcritos de mRNA são expressos tanto nas folhas como nas raízes [85]. Uma vez que esta enzima é ubíqua, na *Annona cherimola* também deverá ser expresso em várias partes da planta.

5. Conclusões

Pretendeu-se sequenciar e caracterizar a MDH e a Vac H⁺ ATPase, que são expressas no processo de amadurecimento do fruto da *Annona cherimola*. Neste trabalho foram amplificados os cDNAs que codificam a MDH e a Vac H⁺ ATPase, utilizando a técnica RACE. Esta técnica revelou-se adequada para o objectivo proposto, uma vez que foram obtidas as extremidades 5' e 3' para os dois genes estudados.

Após a sequenciação procedeu-se à união do 5' RACE com a 3' RACE para cada um dos genes. Verificou-se que a sequência de cDNA para MDH a sequência nucleotídica apresentou 1364 nucleótidos, enquanto para a Vac H⁺ ATPase foram 799 nucleótidos.

Após a análise do cDNA da MDH e verificou-se que este contém uma zona 5' UTR com 84 nucleótidos, uma zona 3' UTR com 284 nucleótidos, que apresenta um sinal de poliadenilação com a sequência AATAAA. A ORF apresenta 996 nucleótidos, codificando uma proteína com 332 aminoácidos.

Pela realização do Blast e da localização dos domínios da ORF pode-se inferir que o objectivo de amplificar a NAD-MDH citosólica foi bem-sucedido.

Para a Vac H⁺ ATPase a 5' UTR continha 36 nucleótidos, a 3' UTR apresentava 265 e a ORF contém 498 nucleótidos, codificando uma proteína com 166 aminoácidos. O codão de terminação é a sequência TGA e contém uma cauda de adeninas com 15 nucleótidos.

Através do Blast e do conhecimento dos domínios codificados pelo ORF do cDNA verifica-se que foi amplificada a subunidade C da Vac H⁺ ATPase. Esta subunidade apresenta um papel muito importante na dissociação reversível dos domínios V₁ e V₀.

Este trabalho deve ser encarado como mais um passo para compreender melhor a expressão da MDH e da Vac H⁺ ATPase durante o amadurecimento na *Annona cherimola*. Contudo, existem algumas sugestões de melhoramento que gostaria de referir:

- Confirmar se estes genes apenas se encontram no fruto, ou também estão presentes nas raízes, caule e folhas da árvore e se existem isoformas ao longo nos diferentes tecidos. Ainda iria permitir identificar a existência de isoformas.

- Tentar amplificar as outras subunidades da Vac H⁺ ATPase, de forma a poder compreender melhor a sua estrutura.

6. Referências Bibliográficas

1. Morton J. Fruits of warm climates [internet]. Miami: Creative Resource Systems, Inc.; 1987. Cherimoya. [acesso em 4 de dez 2011]. Disponível em: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/cherimoya.html>
2. Soler L, Cuevas J. Early flower initiation allows ample manipulation of flowering time in cherimoya (*Annona cherimola* Mill). *Sci Hort* 2009; 121: 327-332.
3. Rodrigues, MIG. Estudo da expressão de genes relacionados com o amadurecimento em *Annona cherimola* Miller [trabalho de conclusão de curso]. Portugal: Universidade da Madeira; 2008.
4. Goulao LF, Cosgrove DJ, Oliveira CM. Cloning, characterisation and expression analyses of cDNA clones encoding cell wall-modifying enzymes isolated from ripe apples. *Postharvest Biol Technol* 2008; 48: 37–51.
5. Prasanna V, Prabha TN, Tharanathan RN. Fruit Ripening Phenomena: An Overview. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2007; 47: 1–19.
6. Sousa, LMVV. Estudo do Processo de Amadurecimento da *Annona Cherimola* Mill. "Madeira" [Dissertação de Mestrado]. Portugal: Universidade da Madeira; 2007.
7. Ocheretina O, Haferkamp I, Tellioglu H, Scheibe R. Light-modulated NADP-malate dehydrogenases from moss fern and green algae: insights into evolution of the enzyme's regulation. *Gene* 2000; 258: 147–154.
8. Tripodi KEJ, Podesta FE. Purification and characterization of an NAD-dependent malate dehydrogenase from leaves of the crassulacean acid metabolism plant *Aptenia cordifolia*. *Plant Physiol Bioch* 2003; 41: 97–105.
9. Seidel T, Kluge C, Hanitzsch M, Roß J, Sauer M, Dietz K, Gollmack D. Colocalization and FRET-analysis of subunits c and a of the vacuolar H⁺ATPase in living plant cells. *J Biotechnol* 2004; 112: 165–175.
10. Sze H, Schumacher K, Muller ML, Padmanaban S, Taiz L. A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H⁺-ATPase. *Plant Sci* 2002; 7: 157-161.
11. Munoz T, Sanchez-Ballesta MT, Ruiz-Cabello J, Escribano MI. The acid metabolism of *Annona* fruit during ripening. *J Hort Sci Biotechnol* 2004; 79: 472-278.
12. Encina CL. Capítulo 3 - *Annonaceae*. In: Litz RE, editor. *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*. Wallingford, UK: CABI Publishing; 2005.

13. Ferreira L, Perestrelo R, Camara JS. Comparative analysis of the volatile fraction from *Annona cherimola* Mill. cultivars by solid-phase microextraction and gas chromatography–quadrupole mass spectrometry detection. *Talanta* 2009; 77: 1087–1096
14. Wele A, Landon C, Labbe H, Vovelle F, Zhang Y. Sequence and solution structure of cherimolacyclopeptides A and B, novel cyclooctapeptides from the seeds of *Annona cherimola*. *Tetrahedron* 2004; 60: 405–414
15. Astudillo ARM, Cueva BC, Valarezo PSA. Genetic diversity and geographic distribution of *Annona cherimola* in Southern Ecuador. *Lyonia* 2004; 7: 159-170.
16. Pinto ACQ, Cordeiro NCR, Andrade SRM, Ferreira FR, Filgueiras HAC, Alves RE, Kinpara DI. *Annona* species. Southampton, UK: Internacional Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, 2005.
17. Paull RE, Duarte O. Capítulo 6 - *Annonas*: Cherimoya, Atemoya and Sweetsop. In: *Tropical Fruits* 2^a ed, Vol 1. Wallingford, UK: CABI Publishing; 2011. p. 123-152.
18. Andres-Agustin J, Gonzalez-Andres F, Nieto-Angel R, Barrientos-Priego AF. Morphometry of the organs of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) and analysis of fruit parameters for the characterization of cultivars, and Mexican germplasm selections. *Sci Hortic* 2006; 107: 337–346
19. Gonzalez M, Cuevas J. Optimal crop load and positioning of fruit in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) trees. *Sci Hortic* 2008; 115: 129-134.
20. Rosell P, Herrero M, Sauco VG. Pollen germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *In vivo* characterization and optimization of *in vitro* germination. *Sci Hortic* 1999; 81: 251-265.
21. Richardson AC, Anderson PA. Hand pollination effects on the set and development of cherimoya (*Annona cherimola*) fruit in a humid climate. *Sci Hortic* 1996; 65: 273-281.
22. Thompson AK. Capítulo 12 - Postharvest technology of fruits and vegetables. In: *Fruit and Vegetables: Harvesting, Handling and Storage*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd; 2003. p.195.
23. Narvaez-Trujillo A, Barreiro JM, Astudillo RM. Tracing the Genetic Base of Cherimoya (*Annona cherimola*) Commercial Cultivars through AFLP Analysis of Diversity at the Species' Putative Center of Origin. In: Litz RE, Scorza R. *Proceeding the International Symposium on Biotechnology of Temperated Fruits*

- Crops & Tropical Species. [acesso em 4 de dez 2011]. Disponível em: http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=738_57
24. Giovannoni J. Molecular Biology of Fruit Maturation and Ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001; 52: 725–749.
 25. Mosca J, Alves RE, Lima GPP. Atividade respiratória de atemóia (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.) cv. Gefner, durante o amadurecimento. *Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.* 2003; 47: 109-110.
 26. Li X, Xu C, Korban SS, Chen K. Regulatory Mechanisms of Textural Changes in Ripening Fruits. *CRC Crit Rev Plant Sci* 2010; 29: 222–243.
 27. Bapat VA, Trivedi PK, Ghosh A, Sane VA, Ganapathi TR, Nath P. Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnol Adv* 2010; 28: 94–107.
 28. Barry CS, Giovannoni JJ. Ethylene and Fruit Ripening. *J Plant Growth Regul* 2007; 26: 143–159.
 29. De Martinis D. Modification of plant development by genetic manipulation of the ethylene biosynthetic pathway. In: *Flower Development, Reproduction and Fruit Ripening: the Role of the Ethylene*. [acesso em 4 de dez 2011]. Disponível em: <http://dare.ubn.kun.nl/bitstream/2066/27437/1/27437.pdf>
 30. Ding CK, Wang CY. The dual effects of methyl salicylate on ripening and expression of ethylene biosynthetic genes in tomato fruit. *Plant Sci* 2003; 164: 589-596.
 31. Centeno DC, Osorio S, Nunes-Nesi A, Bertolo ALF, Carneiro RT, Araujo WL, et al. Malate Plays a Crucial Role in Starch Metabolism, Ripening and Soluble Solid Content of Tomato Fruit and Affects Postharvest Softening. *Plant Cell* 2011; 23: 162–184.
 32. Trincherro GD, Sozzi GO, Cerri AM, Vilella F, Fraschina AA. Ripening-related changes in ethylene production, respiration rate and cell-wall enzyme activity in goldenberry (*Physalis peruviana* L.), a solanaceous species. *Postharvest Biol Technol* 1999; 16: 139–145.
 33. Goni O, Munoz M, Ruiz-Cabello J, Escribano MI, Merodio C. Changes in water status of cherimoya fruit during ripening. *Postharvest Biol Technol* 2007; 45: 147–150.
 34. Assis JS, Maldonado R, Munoz T, Escribano MI, Merodio C. Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit. *Postharvest Biol Technol* 2001; 23: 33–39.

35. Thompson AK. Capítulo 10 - Fruit Ripening conditions. In: Fruit and Vegetables: Harvesting, Handling and Storage. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd; 2003. p.86-96.
36. Kesari R, Trivedi PK, Nath P. Ethylene-induced ripening in banana evokes expression of defense and stress related genes in fruit tissue. *Postharvest Biol Technol* 2007; 46: 136–143.
37. Chen FX, Liu XH, Chen LS. Developmental changes in pulp organic acid concentration and activities of acid-metabolising enzymes during the fruit development of two loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars differing in fruit acidity. *Food Chem* 114 2009; 114: 657–664.
38. Maldonado R, Escribano MI, Carmn Merodio C. Relationship between the levels of ammonia and co-ordination of phenylalanine ammonia-lyase and phosphoenolpyruvate carboxylase in *Annona cherimola* stored under different conditions. *Postharvest Biol Technol* 2002; 25: 301–309.
39. Teixeira LMV. Estudo da expressão dos genes MDH, CS e Vac-H⁺ ATPase no amadurecimento da *Annona Cherimola* Mill [trabalho de conclusão de curso]. Portugal: Universidade da Madeira; 2008.
40. Saradhulhat P, Paull, RE. Pineapple organic acid metabolism and accumulation during fruit development. *Sci Hortic* 2007; 112: 297–303.
41. Tang M, Bie Z, Wu M, Yi H, Feng J. Changes in organic acids and acid metabolism enzymes in melon fruit during development. *Sci Hortic* 2010; 123: 360–365.
42. Johnston JW, Hewett, EW, Hertog MLATM, Harker FR. Temperature and ethylene affect induction of rapid softening in 'Granny Smith' and 'Pacific RoseTM' apple cultivars. *Postharvest Biol Technol* 2002; 25: 257–264.
43. Paull RE. Effect of temperature and relative humidity on fresh commodity quality. *Postharvest Biol Technol* 1999; 15: 263-277.
44. Maldonado R, Molina-Garcia AD, Sanchez-Ballesta MT, Escribano MI, Merodio C. High CO₂ atmosphere modulating the phenolic response associated with cell adhesion and hardening of *Annona cherimola* fruit stored at chilling temperature. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 7564-7569.
45. Moreno E, Castel-Perez ME, Gomes C, Da Silva PF, Moreira RG. Effects of electron beam irradiation on physical, textural and microstructural properties of "Tommy Atkins" mangoes (*Mangifera indica* L.). *J Food Sci* 2006; 71: E80-E86.

46. Li CR, Shen WB, Lu WJ, Jiang YM, Xie JH, Chen JY. 1-MCP delayed softening and affected expression of XET and EXP genes in harvested cherimoya fruit. *Postharvest Biol Technol* 2009; 52: 254–259.
47. De Godoy A, Cordenunsi BR, Lajolo FM, Nascimento JRO. Differential display and suppression subtractive hybridization analysis of the pulp of ripening banana. *Sci Hortic* 2010; 124: 51–56.
48. Alique R, Zamorano JP, Calvo ML, Merodio C, De la Plaza JL. Tolerance of Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) to Cold Storage. *J Am Soc Hortic Sci* 1994; 119: 524–528.
49. Gutierrez M, Sola MM, Vargas AM. Fatty acid composition of phospholipids in mesocarp of cherimoya fruit during ripening. *Food Chem* 2005; 90: 341–346.
50. Munoz T, Ruiz-Cabello J, Molina-Garcia AD, Escribano MI, Merodio C. Chilling temperature storage changes the inorganic phosphate pool distribution in Cherimoya (*Annona cherimola*) fruit. *J Am Soc Hortic Sci* 2001; 126:122–127.
51. Trejo F, Costa M, Gelpi JL, Busquetsa M, Clarkeb AR, Holbrookb JJ, Cortes A. Cloning, sequencing and functional expression of a DNA encoding pig cytosolic malate dehydrogenase: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Gene* 1996; 172: 303-308.
52. Oh TJ, Kim IG, Park SY, Kim KC, Shim HW. NAD-dependent malate dehydrogenase protects against oxidative damage in *Escherichia coli* K-12 through the action of oxaloacetate. *Environ Toxicol Pharmacol* 2002 11: 9–14.
53. Cordwell SJ, Basseal DJ, Pollack JD, Humphery-Smith I. Malate/lactate dehydrogenase in mollicutes: evidence for a multienzyme protein. *Gene* 1997; 195: 113–120.
54. Yao YX, Dong QL, Zhai H, You CX, Yu-Jin Hao YJ. The functions of an apple *cytosolic malate dehydrogenase* gene in growth and tolerance to cold and salt stresses. *Plant Physiol Biochem* 2011; 49: 257-264.
55. Sweetman C, Deluc LG, Cramer GR, Ford CM, Soole KL. Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry* 2009; 70: 1329–1344.
56. Miller SS, Driscoll DT, Gregerson RG, Gantt JS, Vance CP. Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH. *Plant J* 1998; 15: 173-184.

57. Yu D, Ma QH. Characterization of a cytosolic malate dehydrogenase cDNA which encodes an isozyme toward oxaloacetate reduction in wheat. *Biochimie* 2004; 86: 509–518.
58. Kirby RR. Cloning and primary structure of putative cytosolic and mitochondrial malate dehydrogenase from the mollusc *Nucella lapillus* (L.). *Gene* 2000; 245: 81–88.
59. Minarik P, Tomaskova, N, Kollarova M, Antalík M. Malate Dehydrogenases - Structure and Function. *Gen Physiol Biophys* 2002; 21: 257-265.
60. Yao YX, Li M, Zhai H, You CX, Hao YJ. Isolation and characterization of an apple *cytosolic malate dehydrogenase* gene reveal its function in malate synthesis. *Journal of Plant Physiology* 2011; 168: 474–480.
61. Shiratake K, Martinoia E. Transporters in fruit vacuoles. *Plant Biotechnol* 2004; 24: 127–133.
62. Ratajczak R. Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺ - translocating ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1465: 17-36.
63. Maeshima M. Tonoplast Transporters: Organization and Function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001; 52: 469–497.
64. Hayami K, Noumi T, Inoue H, Sun-Wada GH, Yoshimizu T, Hiroshi Kanazawa H. The murine genome contains one functional gene and two pseudogenes coding for the 16 kDa proteolipid subunit of vacuolar H1-ATPase. *Gene* 2001; 273: 199-206.
65. Melnik VI, Bowman BJ. Isolation of the *vma-6* gene encoding a 41 KDa subunit of the *Neospora crassa* vacuolar ATPase and an adjoining gene encoding a ribosome-associated protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1996; 1273: 77-83.
66. Alemzadeh A, Fujie M, Usami S, Yoshizaki T, Oyama K, Kawabata T, Yamada T. ZMVHA-B1, the Gene for Subunit B of Vacuolar H⁺-ATPase from the Eelgrass *Zostera marina* L. Is Able to Replace *vma2* in a Yeast Null Mutant. *J Biosci Bioeng* 2006; 102: 390-395.
67. Choi KY, Ji YJ, Dhakal BK, Yu JR, Cho C, Song WK, Ahnn J. Vacuolar-type H_v-ATPase E subunit is required for embryogenesis and yolk transfer in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 2003; 301: 13–23.
68. Hu M, He L, Campbell BE, Zhong W, Sternberg PW, Gasser RB. A vacuolar-type proton (H_v) translocating ATPase α subunit encoded by the Hc-vha-6 gene of *Haemonchus contortus*. *Mol Cell Probes* 2010; 24: 196-203.

69. Xiao Z, Tan K, Hu M, Liao P, Chen K, Luo M. Cloning and expression analysis of *GhDET3*, a vacuolar H⁺-ATPase subunit C gene, from cotton. *J Genet Genomics* 2008; 35: 307–312.
70. Wilkens S, Zhang Z, Zheng Y. A structural model of the vacuolar ATPase from transmission electron microscopy. *Micron* 2005; 36: 109–126.
71. Gruber G, Godovac-Zimmermann J, Link TA, Coskun U, Rizzo VF, Betz C, Bailer SM. Expression, purification and characterization of subunit E, an essential subunit of the vacuolar ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298: 383–391.
72. Tzanis G, Kavakiotis I, Vlahavas I. PolyA-iEP: A data mining method for the effective prediction of polyadenylation sites. *Expert Syst Appl* 2011; 38: 12398–12408.
73. Robinson NJ, Shirsat AH, Gatehouse JA. Capítulo 10 – Regulation of gene expression. In: Lea PJ, Leegood RC. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. UK: John Wileys & Sons, 1993. p. 222–227.
74. Cann H, Brown SV, Oguariri RM, Golightly LM. 3' UTR signals necessary for expression of the *Plasmodium gallinaceum* ookinete protein, Pgs28, share similarities with those of yeast and plants. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 137: 239–245.
75. Cai B, Peng RH, Xiong AS, Zhou J, Liu JG, Xu F, et al. Identification of polyadenylation signals and alternative polyadenylation in *Vitis vinifera* based on ESTs data. *Sci Hortic* 2008; 115: 292–300.
76. Wu W, Welsh MJ, Kaufman PB, Zhang HH. Capítulo 2 – Rapid isolation of specific cDNAs or genes by PCR. In: *Gene Biotechnology – 2^a ed.* EUA: CRC Press LLC, 2004.
77. Ding Y, Ma QH. Characterization of a cytosolic malate dehydrogenase cDNA which encodes an isozyme toward oxaloacetate reduction in wheat. *Biochimie* 2004; 86: 509–518.
78. Minami Y, Shigeta Y, Tokumoto U, Tanaka Y, Yonekura-Sakakibara K, Oh-oka H, Matsubara H. Cloning, sequencing, characterization, and expression of a β -glucosidase cDNA from the indigo plant. *Plan Sci* 1999; 142: 219–226.
79. Yoder DW, Nampaisansuk M, Pirtle IL, Chapman KD, Pirtle RM. Molecular cloning and nucleotide sequence of a gene encoding a cotton palmitoyl-acyl carrier protein thioesterase. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1446: 403–413.

80. Ma M, Lau PS, Jia YT, Tsang WK, Lam SKS, Tam NFY, Wong YS. The isolation and characterization of Type 1 metallothionein (MT) cDNA from a heavy-metal-tolerant plant, *Festuca rubra* cv. Merlin. *Plant Sci* 2003; 164: 51-60.
81. De Melis LE, Whiteman PH, Stevenson TW. Isolation and characterisation of a cDNA clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase in *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Sci* 1999; 143: 173–182.
82. Kim IJ, Chung WI. Molecular characterization of a cytosolic ascorbate peroxidase in strawberry fruit. *Plant Sci* 1998; 133: 69–77.
83. Armbruster A, Hohn C, Hermesdorf A, Schumacher K, Borsch M, Gruber G. Evidence for major structural changes in subunit C of the vacuolar ATPase due to nucleotide binding. *FEBS Lett* 2005; 579: 1961–1967.
84. Chaban YL, Juliano S, Boekema EJ, Gruber G. Interaction between subunit C (Vma5p) of the yeast vacuolar ATPase and the stalk of the C-depleted V1 ATPase from *Manduca sexta* midgut. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1708: 196–200.
85. Tavakoli N, Eckerskorn C, Golldack D, Dietz KJ. Subunit C of the vacuolar H⁺-ATPase of *Hordeum vulgare*. *FEBS Lett* 1999; 456: 68-72.

Anexos

A sequência nucleotídica da MDH com 388 pb obtida Professora Doutora Manuela Gouveia, DNA molde para o RACE.

5'ATTCCTCTTCTTAAAGGTGTGGTTGCTACAACCTGACGTTGTTGAGGCATGCACTGGTGTCA
ATATTGCTGTTATGGTTGGTGGGTTCCCAAGGAAAGAAGGTATGGAAAGAAAAGATGTGATG
TCCAAAATGTCTCTATCTACAAGTCTCAGGCATCTGCATTAGAGAAGCATGCAGCTGCAAAC
GCAAGGTTCTTGTGTTGCTAATCCAGCTAACCTAATGCATTGATTTTCAAAGAGTTTGTCTCC
ATCCATTCTGAGAAAAATATAACATGCTTGACACGGTTGGATCACAATAGGGCACTTGGTCA
GATCTCAGAGAGGCTAAATGTGCAAGTCAGTGATGTGAAAAATGTTATCATTTGGGGAAATC
ATTCTTCAACA 3'

A sequência nucleotídica da H⁺ ATPase vacuolar com 327 pb obtida pela Professora Doutora Manuela Gouveia, DNA molde para o RACE.

5'ATGAGGCCTGAGCTCGTGATGAAGTCAATCGTCCCAGTCGTTATGGCCGGTGTGTTAGGTA
TTTATGGTTTGATCATAGCTGTGATTATCAGTACTGGAATTAATCCTAGGGCGAAGTCCTACTA
TCTCTTTGATGGGTATGCCACCTCTCGTCGGGTCTTGCTTGCAGTCTTGTCTGGGCTGTCTGCT
GGAATGGCAATTGGAATCGTCGGAGATGCTGGCGTTAGAGCCAATGCTCAGCAGCCAAAAC
TTTTGTTGGGATGATCCTCATTCTCATCTTTGCTGAAGCACTGGCACTTTATGGCCTTATCGTGG
GCATCATCTTA 3'

Resultado do BLAST efectuado no NCBI, para a sequência de cDNA da MDH citosólica da *Annona cherimola*.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
JF428130.1	Corylus heterophylla malate dehydrogenase mRNA, complete cds	926	926	100%	0.0	84%	
XM_002332708.1	Populus trichocarpa predicted protein, mRNA	835	835	98%	0.0	82%	UG
HQ690187.1	Lupinus angustifolius cytosolic malate dehydrogenase (MDH2) mRNA,	804	804	100%	0.0	81%	
XM_002312547.1	Populus trichocarpa predicted protein, mRNA	771	771	100%	0.0	81%	UG
EF144526.1	Populus trichocarpa clone PX0019_P12 unknown mRNA	771	771	100%	0.0	81%	UGM
HQ380175.1	Catharanthus roseus Cr611 mRNA, complete cds	760	760	99%	0.0	81%	
XM_002467034.1	Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA	697	697	99%	0.0	80%	UG
HQ697601.1	Zea mays malate dehydrogenase (MDH) mRNA, complete cds	691	691	99%	0.0	79%	
NM_001153688.1	Zea mays malate dehydrogenase, cytoplasmic (LOC100280767), mRNA	691	691	99%	0.0	79%	UG
CT841990.1	Oryza rufipogon (W1943) cDNA clone: ORW1943C107101, full insert s	675	675	99%	0.0	79%	
NM_001071395.1	Oryza sativa Japonica Group Os10g0478200 (Os10g0478200) mRNA, c	675	675	99%	0.0	79%	UG
AK066396.1	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:J013064D20, full insert sequ	675	675	99%	0.0	79%	UEG
EF122494.1	Oryza sativa (japonica cultivar-group) clone KCS327A11 malate dehy	669	669	99%	0.0	79%	UG
CT832776.1	Oryza sativa (indica cultivar-group) cDNA clone:OSIGCRA117E21, full	669	669	99%	0.0	79%	U
AF353203.1	Oryza sativa cytoplasmic malate dehydrogenase mRNA, complete cds	669	669	99%	0.0	79%	UM
AK353127.1	Thellungiella halophila mRNA, complete cds, clone: RTFL01-10-O22	604	604	100%	3e-169	78%	
CT028615.1	Poplar cDNA sequences	542	542	58%	2e-150	84%	
XM_003626647.1	Medicago truncatula Malate dehydrogenase (MTR_8g005980) mRNA,	529	529	95%	2e-146	77%	G
CT028614.1	Poplar cDNA sequences	510	510	51%	6e-141	85%	
XM_003542284.1	PREDICTED: Glycine max malate dehydrogenase, cytoplasmic-like (LO	494	494	88%	6e-136	77%	G
BT099226.1	Soybean clone JCVI-FLGm-23B10 unknown mRNA	488	488	88%	3e-134	77%	U
XM_002533416.1	Ricinus communis malate dehydrogenase, putative, mRNA	305	305	37%	3e-79	81%	G
AC182655.2	Populus trichocarpa clone Pop1-12105, complete sequence	207	207	18%	9e-50	87%	
EF576153.1	Oryza sativa (indica cultivar-group) clone VI-C2 malate dehydrogena	196	196	36%	2e-46	77%	U
AC182815.52	Medicago truncatula chromosome 8 clone mth2-177e24, complete se	180	180	22%	2e-41	82%	
AC037425.7	Oryza sativa chromosome 10 BAC OSJNBa0055P24 genomic sequence	87.9	87.9	9%	1e-13	84%	

A. cherimola GGTCTCCATGGGTGTGTACTCTGATGGTTCCTACAATGTACCCTGCTGGAC
C. heterophylla GGTATCCATGGGGGTATACTCTGATGGTTCATACAATGTACCAGCTGGAC
P. trichocarpa GGTTCATCCATGGGGGTGTACTCTGATGGCTCGTACAATGTACCAGCTGGTC
L. angustifolius GGTATCAATGGGAGTATATTCTGATGGTTCATACGATGTACCAGCTGGAC
C. roseus GGTCTCCATGGGTGTATACTCAGATGGCTCCTACAATGTCCCTGCTGGTC
*** ** ***** ** ** ** ***** ** *** ***** ** ***** *

A. cherimola TAATATATTCTTTCCAGTCACATGCTGCAGTGGAGAATGGACTATCGTC
C. heterophylla TCATTTATTCCTTCCCTGTCACTTGTTCGCAATGGAGAGTGGAAAGATAGTT
P. trichocarpa TAATTTATTCCTTCCCTGTTACTTGTTCAGAATGGAGAGTGGAAAATTGTT
L. angustifolius TGATCTATTCATTCCTGTCCCGCTGCCAATGGTGAATGGAAAATAGTT
C. roseus TTATTTACTCCTTCCAGTTACATGTAAAAATGGAGAATGGACTGTTGTT
* ** ** ** ***** ** ** * *** ** ***** * **

A. cherimola CAAGGACTTTCAATTGATGAATTTTCGAGGAATAAACTGGATGCAACTGC
C. heterophylla CAAGGACTTTCAATTGATGAGTTCTCGAGGAAGAAGTTGGACTTGACAGC
P. trichocarpa CAAGGTCTTAGCATTGATGAATTCTCAAGGAAAAAGTTGGATTTGACAGC
L. angustifolius CAAGGACTTCCAATTGATGAGTTCTCAAGGAAAAAGTTGGACTTGACAGC
C. roseus CAAGGACTTCCAATTGACGAGTTATCAAGAAAGAAGATGGACTCAACAGC
***** *** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ***** ** **

A. cherimola AGCGGAGCTGACCGAGGAAAAGGCCTTAGCTTATTCATGCCTTTC---T
C. heterophylla AGAGGAGCTGACTGAGGAGAAGGCCTTGGCTTACTCATGCCTCTCTTAG
P. trichocarpa AGATGAGCTTTCTGAGGAGAAGGCCTTGGCTTACTCGTGTCTCACTTAG
L. angustifolius ACAAGAGCTTTCTGAGGAAAAGGCCTTAGCTCACTCTTGCCTCTCTTAG
C. roseus TGAAGAACTCTCTGAGGAAAAGGCCTTGGCATACTCATGTCTTACTTAA
** ** * ***** ***** * ** * ** ** ** *

Resultado do BLAST efectuado no NCBI, para a sequência de cDNA da Vac H⁺ ATPase da *Annona cherimola*.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
XM_002279044.2	PREDICTED: Vitis vinifera V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit c4 (AV)	483	483	95%	7e-133	85%	
FQ394638.1	Vitis vinifera clone SS0AFA1YJ24	483	483	95%	7e-133	85%	
FQ388646.1	Vitis vinifera clone SS0AEB22YG14	483	483	95%	7e-133	85%	
FQ387847.1	Vitis vinifera clone SS0AEB25YC17	483	483	95%	7e-133	85%	
FQ379695.1	Vitis vinifera clone SS0AEA1YK22	483	483	95%	7e-133	85%	
FQ379363.1	Vitis vinifera clone SS0AEB10YK16	483	483	95%	7e-133	85%	
FQ391164.1	Vitis vinifera clone SS0AEB15YI03	483	483	95%	7e-133	85%	
FQ385767.1	Vitis vinifera clone SS0AEB31YD10	483	483	95%	7e-133	85%	
FQ378401.1	Vitis vinifera clone SS0AEB13YK20	483	483	95%	7e-133	85%	
FQ378295.1	Vitis vinifera clone SS0AEB13YP17	483	483	95%	7e-133	85%	
FQ378214.1	Vitis vinifera clone SS0AEB14YE05	483	483	95%	7e-133	85%	
FQ385112.1	Vitis vinifera clone SS0AEB3YF11	483	483	95%	7e-133	85%	
FQ389963.1	Vitis vinifera clone SS0AEB19YC20	483	483	95%	7e-133	85%	
FQ385073.1	Vitis vinifera clone SS0AEB3YH11	479	479	95%	9e-132	85%	
FQ394459.1	Vitis vinifera clone SS0AFA20YK17	477	477	95%	3e-131	85%	
FQ397764.1	Vitis vinifera clone SS0AEB5YM07	477	477	95%	3e-131	85%	
FQ397734.1	Vitis vinifera clone SS0AEB5YN21	477	477	95%	3e-131	85%	
FQ387294.1	Vitis vinifera clone SS0AEB27YB01	477	477	95%	3e-131	85%	
FQ386681.1	Vitis vinifera clone SS0AEB29YB19	477	477	95%	3e-131	85%	
FQ378673.1	Vitis vinifera clone SS0AEB12YN16	477	477	95%	3e-131	85%	
FQ390688.1	Vitis vinifera clone SS0AEB16YP21	477	477	95%	3e-131	85%	
FQ390672.1	Vitis vinifera clone SS0AEB17YA15	477	477	95%	3e-131	85%	
FQ378278.1	Vitis vinifera clone SS0AEB14YA14	477	477	95%	3e-131	85%	
FQ396455.1	Vitis vinifera clone SS0AEB9YN18	472	472	95%	1e-129	85%	
X94999.1	M.crystallinum mRNA for V-type ATPase c subunit	468	468	95%	2e-128	84%	
FQ389388.1	Vitis vinifera clone SS0AEB1YP24	466	466	95%	7e-128	84%	
FQ397085.1	Vitis vinifera clone SS0AEB7Y005	462	462	95%	9e-127	84%	
XM_002510440.1	Ricinus communis vacuolar ATP synthase proteolipid subunit 1, 2, 3, 4	436	436	94%	5e-119	83%	G
CU223876.1	Populus EST from leave	436	436	93%	5e-119	84%	
AM111326.1	Plantago major mRNA for vacuolar H ⁺ -ATPase, subunit C 2 (vATPc2 c)	429	429	98%	9e-117	83%	
FQ387790.1	Vitis vinifera clone SS0AEB25YF09	425	425	93%	1e-115	83%	
FQ386866.1	Vitis vinifera clone SS0AEB28YH20	425	425	93%	1e-115	83%	
XM_002307663.1	Populus trichocarpa predicted protein, mRNA	425	425	93%	1e-115	83%	UG
XM_002300693.1	Populus trichocarpa predicted protein, mRNA	425	425	94%	1e-115	83%	UG
EF147761.1	Populus trichocarpa clone WS0124_N14 unknown mRNA	425	425	93%	1e-115	83%	UGM
EF145225.1	Populus trichocarpa clone WS01121_P07 unknown mRNA	425	425	94%	1e-115	83%	UGM
FQ397763.1	Vitis vinifera clone SS0AEB5YM08	420	420	93%	5e-114	83%	
EF145359.1	Populus trichocarpa clone WS01123_L06 unknown mRNA	420	420	94%	5e-114	83%	UM
NM_106215.3	Arabidopsis thaliana V-type proton ATPase proteolipid subunit c4 (AV)	411	411	98%	3e-111	82%	UEGM
AY098985.1	Arabidopsis thaliana At1g75630/F10A5_17 mRNA, complete cds	411	411	98%	3e-111	82%	UGM
AF424574.1	Arabidopsis thaliana At1g75630/F10A5_17 mRNA, complete cds	411	411	98%	3e-111	82%	UGM
L44584.1	Arabidopsis thaliana vacuolar H ⁺ -pumping ATPase 16 kD proteolipid (c	411	411	98%	3e-111	82%	UEGM
AK321452.1	Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1024DF03, HTC in leaf	405	405	93%	2e-109	82%	U
AK246547.1	Solanum lycopersicum cDNA, clone: FC14BE07, HTC in fruit	405	405	93%	2e-109	82%	UM
AK321734.1	Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1029AE04, HTC in leaf	399	399	93%	7e-108	82%	U
BT012782.1	Lycopersicon esculentum clone 113772R, mRNA sequence	399	399	93%	7e-108	82%	UM
FQ388185.1	Vitis vinifera clone SS0AEB23YP11	390	390	84%	4e-105	83%	
NM_001198475.1	Arabidopsis thaliana V-type proton ATPase proteolipid subunit c4 (AV)	331	331	73%	3e-87	83%	UGM
CP002684.1	Arabidopsis thaliana chromosome 1, complete sequence	248	248	57%	3e-62	82%	
AC006434.5	Genomic sequence for Arabidopsis thaliana BAC F10A5, complete seq	248	248	57%	3e-62	82%	E
AF153677.1	Arabidopsis thaliana vacuolar H ⁺ -pumping ATPase 16 kDa subunit c is	237	237	57%	6e-59	82%	G
AM434100.1	Vitis vinifera, whole genome shotgun sequence, contig VV78X249052	148	148	24%	3e-32	89%	
AM430959.2	Vitis vinifera contig VV78X111633.6, whole genome shotgun sequenc	130	130	22%	1e-26	87%	
AC245332.3	Solanum lycopersicum strain Heinz 1706 chromosome 10 clone sle-51	108	216	24%	5e-20	83%	
AC244781.4	Solanum lycopersicum strain Heinz 1706 chromosome 10 clone hba-51	108	216	24%	5e-20	83%	
AC244737.2	Solanum lycopersicum strain Heinz 1706 chromosome 10 clone hba-61	108	216	24%	5e-20	83%	

Alinhamento múltiplo realizado para a Vac H⁺ ATPase, utilizando o programa T-COFFEE localizado na base de dados ExPASy (<http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi?stage1=1&daction=TCOFFEE::Regular>).

```
A. cherimola      ATGTCTTCTGCTGGCTTCAGCAGCGATGAAACTGCTCCGTTCTTCGGATT
M. crystallinum  ATGTCAACCGT---CTTCAATGGCGATGAAACGGCGCCGTTCTTCGGCTT
R. communis      ATGGCTCCGGC---ATTTAGCGGCGATGAGACTGCTCCTTTCTTTGGGTT
P. plantago      ATGTCTTCTAC---CTTCAGCGGCGATGAAACTGCTCCTTTCTTCGGCTT
P. trichocarpa   ATGTCTTCAAC---ATTCAAGTGGAGATGAAACTGCGCCGTTCTTCGGATT
*** * *          ** * * ***** ** ** * ***** ** **
```

```
A. cherimola      CCTTGGCGCTGCTGCTGCCCTCGTCTTCTCCTGCATGGGGGCTGCGTACG
M. crystallinum  CCTCGGCGCCGCTGCCGCTCTCGTCTTCTCCTGTATGGGAGCTGCGTATG
R. communis      CCTTGGCGCTGCTGCTGCTGCTTTTCTCCTGCATGGGAGCTGCTTATG
P. plantago      CCTGGGAGCCGCTGCTGCCCTCGTCTTCTCCTGCATGGGTGCAGCCTACG
P. trichocarpa   CCTTGGCGCTGCTGCCGCCCTCGTTTTCTCCTGCATGGGAGCTGCTTACG
*** ** * * ***** ** ***** ***** ***** ** ** * *
```

```
A. cherimola      GGAAGTCCCAAGAGCGGGGTTCGGTGTGCTCCATGGGAGTTATGAGGCCT
M. crystallinum  GAACGGCGAAGAGTGGTGTGGAGTGGCATCAATGGGAGTGATGAGGCCT
R. communis      GAACAGCCAAGAGCGGGGTTCGGTGTGGCATCAATGGGTGTGATGAGACCG
P. plantago      GAACGGCGAAGAGTGGTGTGGAGTGGCGTCGATGGGAGTCATGAGGCCT
P. trichocarpa   GTACCGCGAAGAGTGGAGTGGCGTTCGATCAATGGGTGTGATGCGACCA
* ** * * ***** ** ** * * * * * ***** ** *** * **
```

```
A. cherimola      GAGCTCGTGATGAAGTCAATCGTCCCAGTCGTTATGGCCGGTGTGTTAGG
M. crystallinum  GAGCTTGTGATGAAGTCAATGTTCCCAGTTGTTATGGCTGGTGTGTTGGG
R. communis      GAGCTAGTGATGAAATCATTGTTCCGGTGGTTATGGCAGGAGTTTATAGG
P. plantago      GAGCTGGTGATGAAGTCGATTGTTCCAGTGGTTATGGCTGGTGTGTTGGG
P. trichocarpa   GAGCTCGTGATGAAATCCATAGTCCCAGTGGTTCGTTATGGCTGGAGTTTGGG
***** ***** ** ** * * * * * ***** ** ** ** **
```

```
A. cherimola      TATTTATGGTTTGATCATAGCTGTGATTATCAGTACTGGAATTAATCCTA
M. crystallinum  TATTTATGGGTTGATTATTGCTGTGATTATCAGTACTGGGATTAACCCTA
R. communis      TATATACGGTTTGATTATTGCTGTGATCATTAGTACAGGAATTAATCCCA
P. plantago      TATCTATGGTTTGATTATTGCTGTGATTATCAGCACTGGCATTAAACCCCA
P. trichocarpa   TATATACGGTCTGATTATTGCCGTGATTATCAGTACTGGTATTAACCCGA
*** ** * * ***** ** ** ***** ** ** * * ***** ** *
```

```
A. cherimola      GGGCGAAGTCCCTACTATCTCTTTGATGGGTATGCCACCTCTCGTCGGGT
M. crystallinum  AGGCTAAATCTTACTATCTATTTGATGGTTATGCCATCTCTCTTCTGGT
R. communis      AGGCTAAATCCTATTATCTCTTCGACGGATACGCTCACCTCTCTTCTGGT
P. plantago      AGGCCAAGTCTTACTACCTTTTCGATGGGTATGCTCATCTCTCTTCCGGT
P. trichocarpa   AGGCAAAATCCTATTATCTGTTTCGATGGATATGCTCATCTTCTTCTGGT
*** ** * * ** * * * * * ** * * * * * ** * * * * * ** * * *
```

```
A. cherimola      CTTGCTTGGGCTCTTGCTGGGCTGTCTGCTGGAATGGCAATTGGAATCGT
M. crystallinum  CTTGCTTGTGGTCTTGCTGGTTTTGCTGCTGGTATGGCTATTGGTATTGT
R. communis      CTCGCTTGTGGTCTCGTGGTCTTTCTGCTGGTATGGCCATTGGCGTCGT
P. plantago      CTTGCTTGTGGATTGGCTGGTCTTGCTGCTGGGATGGCTATTGGGATCGT
P. trichocarpa   CTCGCCTGTGGCTCGCTGGTCTCTGCTGGTATGGCTATTGGCATCGT
** ** * * * * * ***** * ***** ***** ***** * **
```

```
A. cherimola      CGGAGATGCTGGCGTTAGAGCCAATGCTCAGCAGCCAAAACCTTTTGTG
M. crystallinum  TGGTGATGCTGGTGTAGAGCCAATGCTCAGCAGCCAAAACCTTTTCTGG
R. communis      TGGGGATGCTGGTGTAGAGCTAATGCACAGCAGCCAAAGCTTTTGTG
P. plantago      TGGAGATGCCGGTGTGAGGGCTAATGCACAACAGCCAAAGCTTTTGTG
P. trichocarpa   TGGTGATGCTGGTGTAGAGCTAATGCCAGCAACCAAAGCTTTTGTG
** ***** ** ** * * * * * ***** ** * ***** ***** ** *
```

<i>A. cherimola</i>	GGATGATCCTCATTCTCATCTTTGCTGAAGCACTGGCACTTTATGGCCTT
<i>M. crystallinum</i>	GAATGATTCTTATTCTCATCTTTGCTGAAGCGCTTGCTCTCTACGGTCTC
<i>R. communis</i>	GGATGATCCTCATTCTCATCTTTGCCGAAGCCTTGGCTCTCTATGGCCTT
<i>P. plantago</i>	GCATGATCCTTATCCTCATTTTCGCTGAAGCGTTGGCACTTTACGGTCTT
<i>P. trichocarpa</i>	GTATGATCCTCATTCTCATCTTTGCTGAAGCACTGGCCCTTTACGGTCTC
	* *

<i>A. cherimola</i>	ATCGTGGGCATCATCTTACTATTCCGAGCTGGTCAATCTCGGGCAG---A
<i>M. crystallinum</i>	ATTGTCGGTATCATCTTGTCTTCCCGAGCTGGACAGTCAAGGGCAGATTA
<i>R. communis</i>	ATTGTTGGGATCATACTTTTCGTCCTCCGAGCTGGTCAGTCAAGAGCTGAGTA
<i>P. plantago</i>	ATCGTGGGATCATTCTGTCTTACGAGCTGGCCAATCTAGAGCTGATTA
<i>P. trichocarpa</i>	ATTGTTGGCATCATTCTCTCCTCCCGAGCTGGTCAATCGAGAGCTGAGTA
	** *

<i>A. cherimola</i>	C
<i>M. crystallinum</i>	A
<i>R. communis</i>	A
<i>P. plantago</i>	A
<i>P. trichocarpa</i>	A