

SIMONE DE MIRANDA RODRIGUES

**EXPRESSÃO ECTÓPICA DE UMA ALDEÍDO DESIDROGENASE DE SOJA
EM *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana* CONFERE TOLERÂNCIA A
ESTRESSES ABIÓTICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

Rodrigues, Simone de Miranda, 1979-
R696e Expressão ectópica de uma aldeído desidrogenase
2005 de soja em *Nicotiana tabacum e Arabidopsis thaliana*
confere tolerância a estresses abióticos / Simone de Miranda
Rodrigues. – Viçosa : UFV, 2005.
x, 68f. : il. ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 61-68.

1. Antiquitina - Análise. 2. Aldeído desidrogenase.
3. Organismos transgênicos. 4. Estresse oxidativo.
5. Clonagem molecular. 6. Engenharia genética vegetal.
7. Amostragem (Estatística). I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 631.5233

SIMONE DE MIRANDA RODRIGUES

**EXPRESSÃO ECTÓPICA DE UMA ALDEÍDO DESIDROGENASE DE SOJA
EM *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana* CONFERE TOLERÂNCIA A
ESTRESSES ABIÓTICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2005.

Prof. Luiz Orlando de Oliveira
(Conselheiro)

Profa. Valéria Monteze Guimarães

Prof. Sebastião Tavares de Rezende

Profa. Andrea Miyasaka de Almeida

Profa. Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

A Deus.
Aos meus pais Luiz e Ianete.
As minhas irmãs Shirley e Sheyla.
Aos meus amigos queridos.

AGRADECIMENTOS

À Deus acima de tudo, pela presença em todos os momentos da minha vida.

À meus pais amados, Luiz e Ianete, pelo apoio, força e incentivo durante toda a minha caminhada.

Às minhas irmãs Shirley e Sheyla, pela ajuda, alegria e amizade por todo esse tempo.

Aos meus familiares, pelo carinho e contribuição com a minha formação.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Aos professores, em especial à Profa. Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela orientação e ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos, pelos momentos inesquecíveis.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e do Laboratório de Proteômica, pela colaboração para a obtenção dos resultados.

Aos funcionários de laboratório, pelo convívio agradável.

Aos brasileiros que, muitas vezes sem saber, financiaram meus estudos.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Estresse hídrico.....	3
2.2. Ajustamento Osmótico.....	6
2.3. A superfamília de genes ALDH.....	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1. Material vegetal e experimento na casa-de-vegetação.....	11
3.2. Isolamento de um cDNA de soja, designado de pUFV388 ou <i>TP-55</i> , que codifica um homólogo de antiquitina	11
3.3. Obtenção do anticorpo anti-TP55.....	12
3.3.1. Expressão da proteína TP-55 em <i>E. coli</i> e purificação da proteína recombinante.....	12
3.3.2. Purificação do anticorpo anti-TP55.....	13
3.4. Análise da indução da proteína TP-55 por déficit hídrico e salinidade	13
3.4.1. Extração da proteína total de soja e quantificação.....	13
3.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida e <i>Imunoblotting</i>	14
3.5. Obtenção e análise das plantas transgênicas.....	15
3.5.1. Obtenção do clone pUFV408 e transformação de <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> LBA 4404.....	15

3.5.2.	Obtenção dos clones pK7–Anti e pK7F–Anti e transformação de <i>Agrobactéria tumefaciens</i> GV3101.....	15
3.5.3.	Transformação de <i>N. Tabacum</i> com a construção pUFV408 e <i>A thaliana</i> com as construções pK7–Anti e pK7F–Anti.....	16
3.6.	Diagnóstico molecular das plantas transgênicas.....	17
3.6.1.	Extração do DNA genômico das plantas de <i>A. thaliana</i> e <i>N. tabacum</i>	17
3.6.2.	A reação de PCR (Polimerase Reaction Chain).....	18
3.7.	Localização subcelular da proteína antiqutina em arabdopsis.....	19
3.8.	Análise da expressão do transgene.....	19
3.8.1	Extração de RNA total de <i>N. tabacum</i> transformados com a construção pUFV408.....	19
3.8.2.	RT-PCR.....	20
3.9.	Condições de estresses durante a germinação e em plântulas crescidas <i>in-vitro</i>	20
3.9.1.	Ensaio de germinação em condições de estresse salino.....	20
3.9.2.	Estresse hídrico em plantas transformadas de tabaco.....	21
3.9.3.	Estresse oxidativo por H ₂ O ₂ em sementes transgênicas de <i>N. tabacum</i> e <i>A. thaliana</i>	21
3.9.4.	Indução de dano oxidativo por paraquat e avaliação da clorofila....	22
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1.	Isolamento do cDNA de soja, designado <i>GmTP-55</i> , pertencente à família ALDH7A1 de aldeídos desidrogenases.....	23
4.2.	Superexpressão da proteína TP-55 quimérica.....	27
4.3.	Indução da proteína TP-55 em plantas de soja submetidas a estresses hídrico e salino.....	29
4.4.	Obtenção e análise molecular das plantas transgênicas.....	32
4.5.	Determinção subcelular da proteína antiqutina em arabdopsis.....	36
4.6.	Análise da expressão do transgene.....	37
4.7.	Expressão do gene <i>TP-55</i> em <i>N. tabacum</i> e <i>A. thaliana</i> aumentam tolerância das plantas transgênicas a estresse salino.....	39
4.7.1.	Ensaio de germinação com sementes transgênicas de <i>N. tabacum</i> ..	39
4.7.2.	Ensaio de germinação com sementes transgênicas de <i>A. thaliana</i> ...	43

4.8. Plantas transgênicas de <i>N. tabacum</i> e <i>A. thaliana</i> expressando o gene <i>TP-55</i> apresentam tolerância a estresses oxidativo.....	45
4.8.1. Estresse produzido por H ₂ O ₂	45
4.8.2. Estresse produzido por paraquat.....	50
4.8.3. As linhagens transgênicas de tabaco são mais tolerantes a déficit Hídrico.....	51
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	55
ANEXOS.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

RESUMO

RODRIGUES, Simone de Miranda, M. S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2005. **Expressão ectópica de uma aldeído desidrogenase de soja em *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana* confere tolerância a estresses abióticos.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Conselheiros: Maria Cristina Baracat Pereira e Luiz Orlando de Oliveira.

Antiquitina é uma família de proteínas altamente conservada na evolução que pertence à superfamília de aldeído desidrogenase (ALDH), mas cuja função biológica é desconhecida. Baseado em homologia estrutural e analogia do padrão de expressão, foi isolado um gene da soja, homólogo a antiquitina de humanos, designado *GmTP-55*, que codifica uma proteína de 55,562 kDa, apresentando um domínio conservado de desidrogenases. A proteína TP-55 apresenta 82% de identidade de sequência com a proteína 26g de ervilha, induzida por déficit hídrico, e 60% de homologia com a proteína antiquitina de humanos, pertencentes a família ADLH7A1 (conhecida como antiquitina) da superfamília de ALDH. O acúmulo da proteína TP-55 em plantas de soja foi observado na raiz e predominantemente no caule, sob condições de déficit hídrico e estresse salino. Com a finalidade de examinar a função do homólogo da antiquitina *in vivo*, plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) e *Arabidopsis thaliana* expressando constitutivamente o cDNA *GmTP-55* foram obtidas e submetidas a diversas condições de estresses abióticos. Enquanto que, em *arabidopsis*, a expressão do transgene foi confirmada por RT-PCR, em *Arabidopsis*, a expressão da proteína quimérica TP-55-GFP foi avaliada por microscopia de fluorescência, demonstrando seu acúmulo predominantemente no núcleo e no citoplasma. A expressão ectópica do gene

GmTP-55 tanto em arábido quanto em tabaco conferiu as plantas transgênicas tolerância a estresse salino durante a germinação e a déficit hídrico durante o desenvolvimento. A eficiência de germinação das sementes transgênicas em concentrações crescentes de NaCl foi muito superior do que a dos controles não transformados. Assim também, em condições de seca progressiva, as plantas transgênicas de tabaco mantiveram a turgidez foliar em altos níveis, contrastando com o aparecimento de murcha foliar das plantas controle. As plantas transgênicas também exibiram uma maior tolerância a estresses oxidativos, que foram induzidos por meio de tratamento com H₂O₂ e paraquat. Tanto as sementes de arábido quanto as de tabaco expressando *GmTP-55* germinaram eficientemente em meio contendo 15 µM de H₂O₂, enquanto a germinação das sementes controle foi drasticamente reduzida nas mesmas condições. Similarmente, os discos foliares de tabacos transgênicos tratados com paraquat apresentaram uma redução significativa de lesões necróticas quanto comparadas com as plantas controle. Considerando que o denominador comum resultante dos estresses salino, hídrico e oxidativo seria a produção de ROS e aldeídos tóxicos derivados, estes resultados sugerem que o gene *TP-55*, homólogo da antiqitina, esteja envolvido em respostas celulares adaptativas relacionadas com detoxificação de aldeídos.

ABSTRACT

RODRIGUES, Simone de Miranda, M. S., Universidade Federal de Viçosa, February 2005. **Ectopic expression of a aldehyde dehydrogenase of soybean in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* confer tolerance on abiotics stress.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Committee members: Maria Cristina Baracat Pereira and Luiz Orlando de Oliveira.

Antiquitin is an evolutionarily conserved protein family of unknown function that belongs to the aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily. Based on structural homology and expression pattern analogy, we have isolated an antiquitin homolog gene from soybean, designated *GmTP-55* that encodes a dehydrogenase motif- containing 55.562 kDa protein. The predicted encoded protein, TP-55, shares 82% sequence identity with the water-stress induced 26g protein from peas and 60% homology with human antiquitin that belongs to the ADLH7A1 (known as antiquitin) family of the ALDH superfamily. Accumulation of TP-55 in soybean was detected in roots and mostly in stems under water deficit and salt stress. To examine the role of antiquitin *in vivo*, we have obtained transgenics tobacco (*Nicotiana tabacum*) and *Arabidopsis thaliana* plants constitutively expressing *GmTP-55* and analyzed their response to a variety of abiotic stress conditions. While in tobacco the transgene expression was confirmed by RT-PCR, in *Arabidopsis*, the expression of the TP-55-GFP chimerical protein was evaluated by fluorescence microscopy that demonstrated its major accumulation in the nucleus and cytoplasm. Ectopic expression of *GmTP-55* in both *Arabidopsis* and tobacco conferred tolerance to salinity during germination and to water stress during plant growth. Under increasing salt concentration the germination efficiency of transgenic seeds were much greater than that of untransformed seeds.

Likewise, under progressive drought, the transgenic tobacco kept the shoot turgidity to a normal level, which was in contrast to the leaf wilt phenotype of control plants. The transgenic plants also exhibited an enhanced tolerance to oxidative stresses that were induced by H₂O₂ and paraquat treatments. Both *Arabidopsis* and tobacco seeds expressing *GmTP-55* germinated efficiently in medium supplemented with H₂O₂ 15 μM, whereas the germination of control seeds was drastically reduced under the same condition. Likewise, transgenic tobacco leaf discs treated with paraquat presented a significant reduction in the necrotic lesions as compared to the control leaves. Since the common denominator resulting from salinity, dehydration and oxidative stress is the production of ROS and derived toxic aldehydes, our results suggested that the antiquitin homolog gene might be involved in adaptive responses related to aldehyde detoxification.

1. INTRODUÇÃO

Seca e salinidade excessiva são os principais fatores ambientais que afetam bruscamente o crescimento e a produtividade agrícola de lavouras de interesse econômico ao redor do mundo. Esses tipos de estresses abióticos envolvem mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, como alterações na conformação da membrana celular, tendo como consequência a perda de água pela planta e a diminuição no turgor celular. As plantas que induzem processos que regulam e mantêm o turgor, são capazes de permitir o crescimento continuado, através do ajustamento osmótico (ZIMMERMANN, 1978).

A tolerância ao estresse hídrico apresentado por alguns vegetais consiste de numerosos processos, já que esta é uma característica genética poligênica, que devem funcionar em conjunto para diminuir o desequilíbrio iônico e hiperosmótico. Tal ajustamento requer o controle de íons inorgânicos intracelulares no citoplasma, via sequestro vacuolar, e ou acumulação de compostos orgânicos compartimentalizados principalmente no citoplasma (BINZEL et al., 1988; BOHNERT et al., 1995). Essas espécies de planta apresentam maior turgor durante à seca por acumularem osmólitos sem prejuízo celular, o que caracteriza a tolerância a esse tipo de estresse pelo mecanismo de osmoproteção.

O conjunto de respostas observadas pelas plantas diante do estresse hídrico depende, entre outros fatores, do estágio de desenvolvimento do vegetal, do gênero da planta avaliado e da intensidade do estresse. Em leguminosas, como no caso de soja, a escassez de água durante a fase vegetativa compromete o desenvolvimento do vegetal, resultando no aparecimento de folhas pequenas, entrenós curtos e baixa estatura.

Entretanto, se esse estresse ocorrer durante a fase de florescimento ou de desenvolvimento dos frutos, será observado um aumento excessivo de abortamento de flores, além de impedir a antese, enquanto que na fase de enchimento dos grãos ocorre à diminuição do peso dos grãos e, conseqüentemente, afeta a produção com o aparecimento de frutos murchos ou vazios (BERLATO, 1981; FAGERIA, 1989).

Assim, a identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca são fundamentais no desenvolvimento de novos cultivares comerciais mais tolerantes a esse tipo de estresse. A expressão de genes, ainda não caracterizados, em genótipos mais resistentes a esse fator pode ser usada no estudo de mecanismos de tolerância à seca, além de contribuir na identificação de outros genótipos com características similares.

Nessa investigação foi isolado um cDNA da soja, chamado *TP-55*, altamente homólogo ao gene 26g de ervilha (*Pisum sativum*), cujo produto, uma aldeído desidrogenase, é acumulado principalmente nas células caulinares durante o estresse hídrico. Baseado em análise filogenética de seqüências, o gene *TP-55* foi classificado como membro do grupo ALDH7A de aldeído desidrogenases, altamente conservado entre organismos filogeneticamente distantes. Evidências indicam que as proteínas ALDH7A estão envolvidas na osmorregulação de células vegetais durante o déficit hídrico (WOOD E KRAYESKY, 2002; BRAY, 2004).

O entendimento das funções realizadas pela proteína *TP-55* em células vegetais, pode levar ao desenvolvimento de estratégias moleculares que visem à máxima produção de cultivares através do desenvolvimento de novos genótipos mais adaptados às condições de seca em espécies vegetais relevantes economicamente. Portanto, neste trabalho procurou-se também investigar e analisar a função bioquímica do gene *TP-55* em plantas transformadas de tabaco e arábidoopsis superexpressando esse gene.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estresse hídrico

A produtividade de uma espécie vegetal é determinada pela interação do seu genótipo com as condições ambientais onde se desenvolve. Como as plantas naturalmente são submetidas a algum tipo de estresse biótico ou abiótico, a produtividade de uma cultivar certamente pode ser afetada. Dentre os estresses abióticos, o estresse hídrico é considerado uma barreira na expansão de cultivares agrícolas em certas regiões, por afetar drasticamente a produção, interferindo na taxa de acúmulo de material nutritivo nos grãos e no crescimento normal do vegetal.

O déficit hídrico ou desidratação, entretanto, não é causado somente pela escassez de água no solo, mas também por altas concentrações salina e condições de baixa temperatura, os quais promovem respostas complexas que tem início com a percepção do estresse pelo vegetal, desencadeando uma via de transdução de sinal, a qual é traduzida em mudanças em níveis celulares, fisiológicos e de desenvolvimento (SHINOZAKI E YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997 e BRAY, 1993). O conjunto de respostas observadas depende da severidade e da duração do estresse, do genótipo da planta, do estágio de desenvolvimento e de fatores ambientais que promovem esse estresse.

Sob condições de estresse hídrico, as células das plantas perdem água e diminuem a pressão de turgor. A desidratação celular começa quando a diferença de potencial hídrico é maior do que pode ser compensada pela perda de turgor (TAIZ E ZEIGER, 1998). Esse estresse ocorre na planta quando a taxa de transpiração excede a

taxa de absorção de água pela raiz, induzindo várias respostas fisiológicas, morfológicas e de desenvolvimento. Como aproximadamente 90% do peso da planta é devido à água, certamente esse solvente atua em todos os processos bioquímicos do organismo, movimentando e facilitando a distribuição de gases, minerais e solutos para todos os órgãos do vegetal. Possui, ainda, papel importante na regulação térmica da planta, agindo tanto no resfriamento como na manutenção e distribuição do calor (NEPOMUCENO, 1994). Assim, a escassez de água pode afetar ainda a eficiência do processo fotossintético, tanto de forma direta, através da desidratação do citoplasma, ou indiretamente, devido ao fechamento estomático (MIYASAKA E MEDINA, 1981).

A resposta de tolerância da planta à salinidade consiste de numerosos processos que devem funcionar em coordenação para minimizar tanto o desequilíbrio da concentração iônica intracelular como a hiperosmolaridade, aliviando efeitos secundários causados por esse estresse como o comprometimento da produção e do acúmulo de biomassa pelo vegetal ou efeitos patológicos (HASEGAWA et al., 2000; ZHU, 2001). Plantas que mostram crescimento continuado ou melhorado sob condições hídricas limitadas são consideradas tolerantes à seca. Algumas espécies podem evitar a seca amadurecendo rapidamente ou reproduzindo-se somente após a chuva (ALVIM et al., 1985). Outras toleram a desidratação, prevenindo-a através do desenvolvimento de raízes profundas, fechando-se fortemente contra a transpiração ou acumulando grandes reservas de água em tecidos carnosos (INGROUILLE, 1992). Ainda, outras espécies permitem a desidratação dos tecidos e toleram a falta de água, apresentando crescimento continuado mesmo quando desidratadas ou sobrevivendo a desidratações severas. O potencial químico da solução salina inicialmente estabelece o desequilíbrio do potencial hídrico entre as vias apoplásticas e simplásticas, levando a uma diminuição do turgor, e que se suficientemente severa causa redução no crescimento. A estagnação do crescimento ocorre quando o turgor é reduzido a níveis mais baixo que o limiar de crescimento da parede celular (BOHNERT et al., 1995).

Dentre as conseqüências provocadas pelo excesso de sal no meio, podem ser citadas o retardamento da diferenciação do xilema primário e a aceleração do desenvolvimento do xilema secundário, apesar de não serem observadas alterações na atividade enzimática de peroxidases nessa região. Tais mudanças morfológicas foram observadas em estudos realizados com raiz de soja submetidas a estresse salino (HILAL et al. 1997). Esse estresse causa também um rápido decréscimo na taxa do crescimento foliar, devido à diminuição da velocidade de alongação da folha em conseqüência da

redução da elongação e da multiplicação celular (MUNNS, 1993). Foi verificado que o cultivo de trigo é significativamente afetado quando submetido à escassez de água no solo, tanto durante a fase vegetativa quanto na fase reprodutiva, provocando redução no peso da planta e diminuição do desenvolvimento da área foliar (KATERJI et al. 2003). Do ponto de vista biofísico, uma célula da folha de uma planta tratada com NaCl expande-se a reduzidas taxas, quando comparada a células controles, por apresentar paredes endurecidas ou baixo nível de turgor, consequência do reduzido fluxo de água ou osmólitos em nível celular (COSGROVE, 1993).

Uma variedade de genes que respondem à seca, a salinidade e ao frio, e que apresentam função protetora na célula tem sido descritas (INGRAM E BARTEELS, 1996; SHINOZAKI E YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1996; BRAY, 1997). Alguns desses genes tiveram seus promotores analisados, mostrando a presença de vários elementos cis-ativadores dependentes ou independentes do hormônio ABA encontrado em plantas (SHINOZAKI E YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997). A função do produto desses genes tem sido predita por comparação de seqüências homólogas com proteínas conhecidas e acredita-se possuírem um papel na proteção da célula diante do estresse hídrico (INGRAM E BARTELS, 1996; BRAY, 1997). A variedade e as mudanças na expressão de genes são fundamentais para as respostas que ocorrem durante o déficit hídrico, tendo sido relatados esses genes em várias espécies como controladores de muitas respostas a curto e a longo prazo (BRAY, 1993).

Observações têm revelado que os genes induzidos durante condições de estresse hídrico funcionam não somente na proteção da célula ao déficit hídrico, codificando importantes proteínas envolvidas diretamente no aumento da tolerância da célula ao estresse, mas também como fatores que atuam na regulação de genes envolvidos na via de transdução de sinal em resposta à escassez de água (SHINOZAKI E YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997). Desse modo, os produtos desses genes são classificados basicamente em dois grupos. Um primeiro grupo é constituído por proteínas que funcionam provavelmente promovendo tolerância ao estresse: proteínas que formam canais de passagem de água através da membrana (aquaporinas), as enzimas requeridas para a biossíntese de vários osmoprotetores como açúcares, Pro e Gly-betaína, proteínas que podem proteger macromoléculas e membranas (chaperones moleculares, proteína LEA, osmotina e proteínas de ligação ao mRNA), proteases envolvidas no *tunorver* de proteínas (proteases tiol, proteases CLp e ubiquitina) e enzimas que promovem a detoxificação (glutathione S-transferase, catalases, ascorbato peroxidase, superóxido

dismutase). Alguns genes induzidos por estresse, que codificam proteínas, tal como enzimas chave para a biossíntese de prolina, foram superexpressadas em plantas transgênicas produzindo um fenótipo tolerante ao estresse, indicando que os produtos desses genes possuem função protetora contra estresses. O segundo grupo contém fatores protéicos envolvidos na regulação da transdução de sinal e a expressão de genes que provavelmente funcionam em resposta ao estresse, como as proteínas quinases, fatores de transcrição e PLC (SHINOZAKI E YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997).

2.2. Ajustamento osmótico

Dentre as respostas fisiológicas/moleculares apresentadas pelas plantas para aumentar o turgor celular durante o déficit hídrico, podem ser citadas o ajustamento osmótico e a osmoproteção, o que reflete na habilidade que algumas espécies de planta têm de ajustar osmoticamente suas células, mantendo o potencial hídrico. A redução desse potencial a nível celular abaixo do potencial hídrico externo, resulta de uma diminuição do potencial osmótico, o que possibilita a movimentação da água na célula. O potencial osmótico dentro da célula é inferior à acumulação de osmólitos no citoplasma. Mudanças no potencial osmótico causado pela concentração de solutos, resultante da perda de água e aquelas causadas pela acumulação ativa de solutos são distintas. Reduções no potencial osmótico ocorrem pelo aumento na concentração de solutos presentes na célula túrgida. O ajuste osmótico, portanto, ocorrerá somente se ocorrer o acúmulo ativo de solutos (GUO E OOSTERHUIS, 1997), propiciando, em várias espécies, o aumento na capacidade de tolerar períodos curtos de seca.

Genes que codificam enzimas para a síntese desses osmólitos têm sido identificados e, em alguns casos, esses genes são induzidos por déficit hídrico (BRAY, 1997). Além disso, foi documentado que muitos osmoprotetores aumentam a tolerância ao déficit hídrico em plantas quando expressados como produtos transgênicos (BOHNERT E JENSEN, 1996; ZHU, 2001).

A tolerância salina conferida pelos osmoprotetores requer que esses solutos, classificados como compatíveis, se acumulem no citosol e organelas, onde deverão funcionar no ajustamento osmótico e osmoproteção. Entretanto, os solutos acumulados nessas condições variam com o organismo e também entre espécies de plantas. Tem sido observada alta capacidade de ajuste osmótico em espécies como o sorgo e o

algodão; ajustes mais moderado são observados em girassol, enquanto o trigo e a soja normalmente apresentam baixa capacidade de ajuste (OOSTERHUIS E WULLSCHLEGER, 1988).

Metabólicos freqüentemente observados com funções osmóticas são os açúcares, principalmente sacarose e frutose, álcool açúcares como glicerol, inositol metilados, e açúcares complexos (trealose, rafinose e polímeros de frutose). Ainda, íons (K^+) ou metabólitos modificados (glicina betaína, dimetil-4-carboxil pirimidina, prolina e ectoína) também são relatados (HASEGAWA et al. 2000). Esses solutos podem ser acumulados normalmente em altos níveis e reduzir os efeitos inibitórios de atividade enzimática e iônica por aumentar a estabilidade térmica de enzimas que estão em solução salina, sem perturbar a bioquímica intracelular, prevenindo a dissociação de complexos enzimáticos. De fato, o osmólito glicina betaína preserva os tilacóides e a integridade da membrana plasmática após exposição do vegetal a condições de estresse hídrico, até mesmo em baixas concentrações (RHODES E HANSON, 1993; YOKOI, 2002).

A síntese desses osmólitos é freqüentemente realizada pela diversificação de metabólicos intermediários dentro de reações bioquímicas únicas (BRAY, 1993). Plantas superiores acumulam ativamente açúcares, ácidos orgânicos e íons, diminuindo o potencial osmótico e, conseqüentemente, mantêm o potencial hídrico e o turgor de suas células próximo do nível ótimo. Quando o turgor é mantido, processos como condutância estomática, taxa de assimilação de CO_2 e expansão dos tecidos são total ou parcialmente mantidas (LUDLOW, 1987; NEPOMUCENO et al., 1998). Uma substância capaz de atuar na osmoproteção é a betaína aldeído desidrogenase (BADH), que é induzida em resposta a estresse osmótico e catalisa a síntese do osmólito glicina betaína a partir de colina por duas reações que são catalisadas em seqüência pelas enzimas colina monoxigenase e betaína aldeído desidrogenase (RHODES E HANSON, 1993).

2.3. A superfamília de genes ALDH

Aldeídos desidrogenases constituem uma diversa família de proteínas encontradas em vários organismos com importantes funções biológicas. São moléculas que catalisam a oxidação de aldeídos a seus ácidos carboxílicos correspondentes,

requerendo NAD (P⁺) como cofator (PEROZICH et al., 1999a). Aldeídos são intermediários em diversas vias bioquímicas fundamentais, sendo gerados durante o metabolismo de carboidratos, vitaminas, esteróides, aminoácidos e lipídeos (YOSHIDA et al., 1998; VASILIOU et al., 2000). Como já mencionado, aldeídos também podem ser sintetizados em resposta a estresses ambientais que perturbam o metabolismo, incluindo salinidade, desidratação, dissecação, frio e temperaturas altas (BARTELS 2001; BARCLAY et al., 1994). Aldeídos desidrogenases possuem alta atividade, representando uma estratégia de defesa na detoxificação de aldeídos, sendo consideradas em geral como enzimas de detoxificação (YOSHIDA et al., 1998).

O Comitê de Nomenclatura do Gene ALDH (AGNC) estabeleceu um critério específico para a catalogação de seqüências das proteínas ALDH deduzidas (VASILIOU et al., 1999). Seqüências de proteínas que apresentam mais de 40% de identidade a outras seqüências de ALDH identificadas previamente compõem uma mesma família, as seqüências que apresentam mais de 60% de identidade compõem uma subfamília de proteínas; enquanto que seqüências de proteínas que apresentam menos de 40% de identidade deveriam descrever uma nova família de proteínas ALDH.

Uma classificação prévia da superfamília de genes, baseadas na seqüência de identidade dessas proteínas, identificou 21 famílias de proteínas ALDH em organismos eucarióticos (PEROZICH et al., 1999a e 1999b; SOPHOS et al. 2001). Atualmente, as enzimas de plantas estão representadas em 11 dessas famílias de ALDH (ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH7, ALDH10, ALDH11, ALDH12, ALDH18, ALDH19 e ALDH21) e 3 famílias de proteínas que são únicas para as plantas (ALDH11, ALDH19 e ALDH21) (WOOD E KRAYESKY, 2002; BRAY, 2004).

Com o sequenciamento completo do genoma de *Arabidopsis*, open reading frames (ORFs) putativas de ALDH foram anotadas e comparadas com seqüências de cDNAs de ALDH já identificadas. Essa pesquisa resultou na descoberta de 14 seqüências que poderiam codificar proteínas com seqüência conservada de aldeído desidrogenases. (KIRCH et al, 2004), além de ter sido identificado um único gene pertencente à família ALDH7B4, que provavelmente codifica uma proteína de resposta a turgor (GUERRERO et al., 1990; STROEHER et al., 1995; BRAY, 2004).

Em ervilha (*Pisum sativum*) foi identificada uma proteína denominada de 26g, a qual possui expressão aumentada quando a planta é submetida ao estresse hídrico, tendo sido classificada como uma desidrogenase (GUERRERO, 1990). As enzimas do tipo aldeído desidrogenases possuem uma seqüência de aminoácidos (VTLELGGKS),

apresentando um resíduo de cisteína após 28 resíduos de aminoácidos a partir dessa seqüência conservada. Apesar dessa seqüência ser pouco conservada (TLLELSGNN) na proteína de ervilha, a proteína 26g possui o resíduo de cisteína localizado nessa mesma posição (GUERRERO et al., 1990). Essa desidrogenase torna-se interessante já que tanto as enzimas Betaína desidrogenase (BADH) quanto a ABA aldeído desidrogenase estão envolvidas na resposta de desidratação em algumas plantas (GUERRERO et al., 1990).

Várias desidrogenases descritas na literatura atuam nos processos de regulação osmótica, como por exemplo, o gene *Aldh2a*, uma aldeído desidrogenase de *Oryza sativa*, que tem sua expressão aumentada sob condições anaeróbicas, provavelmente confere maior tolerância às condições submergidas de arroz (NAKAZONO et al., 2000). Cp-ALDH e Ath-ALDH3 de *Craterostigma plantagineum* e *A. thaliana* respectivamente, respondem a uma ampla variedade de estresses, incluindo estresse oxidativo, o qual causa uma rápida acumulação de espécies reativas a oxigênio (ROS) em plantas (KIRCH et al., 2001; SUNKAR et al., 2003). Em *Arabidopsis* dois genes ALDH respondem à alta salinidade, desidratação e frio, como mostrado em análises de microarrays (SEKI et al., 2002). Homólogos do ALDH7B em angiosperma são induzidos por diversos tipos de estresses incluindo desidratação, altas e baixas temperaturas e altas concentrações de ABA (WOOD E KRAYESKY, 2002).

Análises de northern blot utilizando tecidos humanos mostraram que uma proteína homóloga a 26g, denominada antiquitina é altamente expressa na cóclea, ovário, olhos, coração, fígado e nos rins de humanos, sendo que quantidades mínimas foram descritas em leucócitos da periferia do sangue e culturas de fibroblastos (VASILIOU et al., 2000). Essa proteína possui um peso molecular de 55,285 kDa e apresenta 60% de identidade de seqüência com 26g de ervilha. Os 66 aminoácidos da porção carboxi terminal entre essas duas proteínas apresentam 86% de identidade, e um segmento de 52 aminoácidos apresenta 92% de identidade (LEE et al., 1994). Mesmo desconhecendo a função da proteína antiquitina de humanos, acredita-se que ela esteja envolvida na regulação da pressão de turgor celular, sob o déficit hídrico ou exposição a altas concentrações salinas; sintetizando osmoprotetores orgânicos, como ALDH9 (betaína aldeído desidrogenase), contribuindo para a restauração de turgor durante período de estresse (STROEHER, et al., 1995), entretanto a exata função da antiquitina permanece por ser elucidada (SKVORAK, et al., 1997).

A estrutura primária da antiquitina mostra uma larga região hidrofóbica internamente, um possível domínio transmembrana, o qual sugere que essa proteína pode ter uma função de transporte (LEE, et al., 1994; SKVORAK, et al., 1997). Baseado na análise da seqüência, a antiquitina é classificada como um membro da superfamília de aldeído desidrogenases ALDH7A1. Apresenta domínio característico conservado essencial para a atividade catalítica, apontando assim um papel catalítico em certas vias metabólicas relacionadas ao estresse osmótico por essa proteína (STROEHER, et al., 1995; PEROZICH, et al., 1999b). Devido alta homologia entre essas proteínas, de planta e de animal, acredita-se que essas proteínas possuam um indispensável papel fisiológico na célula, o qual deve ter sido conservado evolutivamente. Entretanto, a função fisiológica de membros da família ALDH7A1 de aldeídos desidrogenases permanece por ser elucidada, sendo a rota metabólica associada a esta enzima desconhecida.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e experimentos na casa-de-vegetação

Plantas de soja variedade BR16 foram cultivadas em casa-de-vegetação sob condições padronizadas de luz, umidade relativa e temperatura. Com o objetivo de avaliar o padrão de expressão da proteína TP-55 de soja, plantas de soja no início da floração foram submetidas a condições de seca, estresse salino 300 mM NaCl e estresse salino 600 mM NaCl, independentemente, por 9 dias sob condições controladas, até o aparecimento evidente de murcha nas folhas. Em seguida foram coletadas em nitrogênio líquido, raízes, caules, folhas fonte e folhas dreno das plantas de soja submetidas a essas condições de estresses e também de plantas de soja não estressadas, para proceder com a extração de proteínas totais desses órgãos e realizar *Imunoblotting*.

3.2. Isolamento de um cDNA de soja, designado pUFV388 ou TP-55, que codifica um homólogo de antiquitina

Um cDNA que codifica uma aldeído desidrogenase homóloga a antiquitina de humanos, pertencente à subfamília ALDH7, foi isolado previamente de um banco de dados de ESTs de *Glycine max* desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do BIOAGRO, a partir de uma biblioteca de cDNAs de sementes de soja submetidas a estresse hídrico, sendo analisado por comparação de seqüência utilizando o programa BLAST. Esse cDNA foi designado pUFV388, e a seqüência completa desse

clone foi obtida e enviada para o GeneBank com o número de acesso AY250704. O sequenciamento completo do clone, revelou que o mesmo codifica uma proteína com peso molecular de aproximadamente 55 kDa, a qual foi denominada de TP-55 (turgor protein).

A seqüência de aminoácidos correspondente a proteína TP-55 foi avaliada pelo programa DAS (Transmembrane Prediction server), usando seqüências aleatórias em janelas de cinco aminoácidos, permitindo estimar o grau de hidrofobicidade em diferentes posições na proteína. Foi realizada também uma análise comparativa entre seqüências de aminoácidos de aldeído desidrogenases de diferentes organismos, usando o programa “DNAMAN”. As seqüências das proteínas foram obtidas no banco de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) e usadas para a construção de uma árvore com base em similaridade de seqüências de aminoácidos entre as ALDHs de diferentes organismos.

3.3. Obtenção do anticorpo anti-TP-55

3.3.1. Expressão da proteína TP-55 em *E. coli* e purificação da proteína recombinante

Com a finalidade de expressar a proteína TP-55 de soja em bactéria, o clone pUFV388 foi digerido com a enzima *Bam*HI, liberando um fragmento de aproximadamente 1300pb que estende desde a posição do nucleotídeo 336 do cDNA do clone pUV388 até o sítio de *Bam*HI no polylinker do vetor pBS (SK+). Esse fragmento foi purificado de gel de agarose usando o *kit* da BIORAD e inserido no sítio *Bam*HI do vetor pET-16b, previamente digerido e defosforilado (DELÚ-FILHO et al, 1999). Em seguida foi feito o diagnóstico do clone na orientação do inserto utilizando as enzimas *Bam*HI e *Xba*I.

A indução da proteína recombinante com IPTG foi conduzida em *E. coli* estirpe BL21(DE₃), que contém um gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor *lac* (NOVAGEN). Em seguida, as bactérias contendo o cDNA que codifica TP-55 foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g por 10 minutos e ressuspensas em tampão de ligação 1X (Tris-HCl 40 mM pH 7,9, Imidazol 1 mM, NaCl 1 M e uréia 6 M). O rompimento das células ocorreu mecanicamente por ultra-sonicação em

Ultrasonic Homogenizer 4710 Series (COLE PARMER), seguida de centrifugação a 39.000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm e aplicado em coluna de cromatografia contendo resina *Chelating Sepharose* (PHARMACIA) ativada com Ni⁺². A proteína recombinante foi eluída utilizando tampão de eluição (Imidazol 1M, NaCl 0,5 M e Tris-HCl 80 mM M pH 7,9 e uréia 6 M), purificada e utilizada para imunizar coelho e produzir o anticorpo policlonal contra a proteína TP-55.

3.3.2. Purificação do anticorpo anti-TP55

A purificação do anticorpo, anti-TP55, foi realizada segundo REIS (1997), por cromatografia de afinidade em resina de proteína A (NOVAGEN), cuja proteína foi isolada de *Staphylococcus aureus*. Uma alíquota de 1 mL do anticorpo anti-TP55 obtido de coelho foi equilibrado com 1/10 desse volume com tampão Tris-HCl 1 M pH 8,0, e em seguida foi aplicado na coluna cromatográfica contendo resina de proteína A, para que as imunoglobulinas da classe IgGs ficassem retidas na resina. A coluna foi previamente equilibrada com o mesmo tampão, e após o anticorpo ser passado na coluna, esta foi lavada com o volume de dez vezes do tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0, seguido do mesmo volume do tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0. Os anticorpos da fração IgG retidos na coluna foram eluídos utilizando o volume de 5 vezes de glicina 100 mM pH 3,0, alíquotados e equilibrado com Tris-HCl 1M pH 8,0. A quantificação do anticorpo purificado foi feita usando leitura de absorbância a 280nm, antes de ser estocado a -80 °C.

3.4. Análise da indução da proteína TP-55 por déficit hídrico e salinidade

3.4.1. Extração de proteína total de soja e quantificação

Para a extração de proteínas totais de caule, raiz, folha velha e folha nova de plantas de soja, 500 mg de cada um desses órgãos do vegetal foram macerados em nitrogênio líquido usando cadinho e pistilo. Ao macerado, foi adicionado tampão de extração (TCA 10% em acetona e -mercaptoetanol 0,07%) na proporção de 1:5 de

material vegetal para o tampão de extração, respectivamente, seguida de precipitação das proteínas totais por 3 h a 4°C. Em seguida, o material foi centrifugado a 20.000 x g durante 20 minutos, e o pellet protéico foi lavado com acetona seguido de centrifugação por 5 minutos a 20.000 x g até o sobrenadante ficar claro. O precipitado de acetona foi liofilizado por 4 h e ressuspenso em 400 µL de tampão de eluição (uréia 8 M, Triton 4%, DTT 60 mM). O rompimento das células ocorreu mecanicamente por ultrassonicação com 4 pulsos de 10 segundos em *Ultrasonic Homogenizer 4710 Series* (COLE PARMER). As proteínas totais foram coletadas da porção sobrenadante após centrifugação por 20.000 x g por 20 minutos. A concentração das proteínas totais nos diferentes órgãos de soja foi determinada pelo método de BRADFORD (1976).

3.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida e *Imunoblotting*

Quantidades iguais dos extratos de proteínas totais dos diferentes órgãos da soja (raiz, caule e folhas), foram separados em SDS-PAGE com concentração de acrilamida + bis 10% (p/v) (LAEMMLI, 1970), no tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM, EDTA 1 mM e SDS 3,5 mM) e voltagem constante de 100V. Após eletroforese, os géis foram revelados em solução corante [metanol 45%(v/v), etanol 9% (v/v) e coomassie brilliant blue R250 0,01% (p/v)] por 2 horas e em seguida, descorados em solução descorante [metanol 25% (v/v) e ácido acético glacial 7,5% (v/v)]. Alternativamente, as proteínas corridas em gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando-se o equipamento *Transblot* da BIORAD. A membrana de nitrocelulose foi incubada com o reagente de bloqueio *Blotting Grade Blocker, Non-Fat Dry Milk* (BIORAD) por no mínimo 1 h à temperatura ambiente e lavada com TBS-T [Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, NaCl 0,015 mM, Tween-20 0,1% (v/v)]. Para imunodeteção da proteína TP-55, foi utilizado o anticorpo policlonal de coelhos contra a proteína TP-55 na diluição de 1:1000. Como segundo anticorpo, foi utilizado o anticorpo comercial de coelho IgG anti-coelho (SIGMA), conjugado à enzima fosfatase alcalina (SIGMA), numa diluição de 1:5000. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada utilizando-se os substratos BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) NBT (azul-nitro tetrazólio) da GIBCO BRL.

3.5. Obtenção e análise das plantas transgênicas

3.5.1. Obtenção do clone pUFV408 e transformação de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404

Os procedimentos de clonagem foram realizados segundo SAMBROOK et al. (1989). O cDNA pUFV388, que codifica a proteína TP-55, foi digerido no sítio de *EcoRI* e o fragmento de aproximadamente 1900 pb foi inserido no mesmo sítio da enzima no polylinker do vetor de expressão em plantas pCambia 1301Z. O clone resultante pUFV408, contendo a região codificadora de TP-55 sob o controle do promotor 35S do CaMV e sinais de poliadenilação do gene *nos*, foi usado para transformar *A. tumefaciens* estirpe LB4404. As colônias transformadas foram recuperadas em meio seletivo contendo 100 mg L⁻¹ de kanamicina e 100 mg L⁻¹ de estreptomicina, e diagnosticadas por PCR (Polimerase Reaction Chain) usando primers que anelam em regiões específicas do gene que confere resistência a higromicina, presente no T-DNA do vetor pCambia 1301Z, cujas seqüências são 5'CGCTTCTGCGGGCGATTTGTGTACG3' "forward" e 5'TCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGG3' "reverse". Na reação de PCR, foram utilizados 20 ng de DNA, 80 pmol de cada oligonucleotídeo citados acima, dNTP's 0,25 mM/L cada, 1 U de Taq polimerase, e tampão (MgCl₂ 2,0 mM, Tris-HCl 2,0 mM pH 8,4, KCl 50 mM) para um volume final de 25 µL. As condições de reação adotadas consistiram de 3 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos (45 segundos a 94 °C, 1 minuto e 30 segundos a 55 °C e 2 minutos a 72 °C), seguindo 10 minutos a 72 °C. A reação de amplificação foi conduzida em um termociclador *MJ RESEARCH Peltier Thermal Cycler* PTC 2000 e os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) e corado com brometo de etídeo 0,1 µg/mL.

3.5.2. Obtenção dos clones pK7-Anti e pK7F-Anti e transformação de *Agrobactéria tumefaciens* GV3101

Os vetores recombinantes pK7-Anti e pK7F-Anti foram obtidos através do sistema *GATEWAY* (Invitrogen Life Technologies Inc.). O cDNA que codifica para a

proteína TP-55 foi amplificado por PCR com Pfu polimerase e primers específicos contendo extensões apropriadas em suas extremidades, analisado em gel de agarose (0,9% p/v) e introduzido via recombinação no vetor de entrada pDON201, utilizando BP clonase (INVITROGEN). Em seguida, o cDNA da TP-55 foi transferido para os vetores de expressão de planta pK7WG2 ou pK7FWG2, utilizando a LR clonase para obter os clones pK7-Anti e pK7F-Anti, respectivamente. Na construção pK7-Anti, o cDNA de TP-55 está sob o controle do promotor CaMV 35S. A construção pK7F-Anti contém o gene *GFP* fusionado em sentido correto após o último códon de TP-55, também sob o controle do promotor CaMV 35S.

3.5.3. Transformação de *N. Tabacum* com a construção pUFV408 e *A. thaliana* com as construções pK7-Anti e pK7F-Anti

Arabidopsis thaliana estirpe GV3101, contendo as construções pK7-Anti e pK7F-Anti separadamente foram inoculadas em meio LB seletivo (40 mg.L⁻¹ de gentamicina e 100 mg.L⁻¹ de espectinomicina) por 24 h a 28 °C. Em seguida, 4 ml do inóculo foram usados para inocular 200 mL de LB seletivo, o qual foi incubado por 24 h a 28 °C. Após o período de incubação, as células foram sedimentadas por centrifugação, ressuspensas em 250 mL de sacarose 5% (p/p), contendo Silwett L-77 3% (p/v) e usadas para transformar *Arabidopsis* pelo método de mergulhamento floral (FONTES et al., 2004). As plantas recém transformadas foram mantidas em casa-de-vegetação para a obtenção de sementes. Essas sementes transgênicas contendo as construções pK7-Anti e pK7F-Anti foram esterilizadas (etanol 70%, triton 0,05% X-100 por 5 min, seguido de etanol absoluto por 1 min.) e plaqueadas em meio MS (MURASHIGE E SKOOK, 1962) meia força contendo kanamicina 50 mg.L⁻¹ para a seleção dos transformantes independentes. As placas contendo as sementes foram incubadas por 2 dias a 4 °C antes de serem transferidas para uma incubadora a 20 °C e fotoperíodo de 16 h para o crescimento das plantas. Após um mês de germinação, os transformantes independentes foram transplantados para vasos e mantidas em casa de vegetação na temperatura de 22 °C para a obtenção de sementes da geração F2 (T1).

Para transformação de tabaco, a estirpe LBA 4404 de *A. tumefaciens* contendo a construção pUFV408 foi inoculada em meio seletivo e (100 mg.L⁻¹ de estreptomicina) por 12 h a 28 °C e em seguida transferidas para meio rhizo. Após o crescimento das

agrobactérias, estas foram repassadas para meio MS líquido (MURASHIGE E SKOOK, 1962) suplementado com sacarose 3% (p/v), i-inositol 100 mgL⁻¹ e vitaminas B-5 de Gamborg 1% (v/v), até atingirem a OD de 0,4. Discos foliares de *Nicotiana tabacum* var. Havana foram incubados com as agrobactérias durante 15 minutos, e após o período de co-cultivo, os discos foliares foram lavados com água estéril, secos em papel, e colocados em placas de Petri, contendo meio MS0 sólido sem antibióticos por 2 dias. Após o período de co-cultivo, os possíveis transformantes foram selecionados em meio MS0 suplementado com BAP 0,4 mg/L, timetin 500 mg/L (SMITHKLINE BEECHAM, FARMACÊUTICOS) e 50 mg/L de kanamicina (SIGMA). Após 3-4 semanas, os transformantes primários (T0) foram regenerados e enraizados em magentas (SIGMA) contendo meio MS0 sólido. Os transformantes foram separados, clonados e mantidos *in vitro* antes de serem diagnosticados por PCR. Quatro transformantes independentes (progênie T0), designados T0 TP-55 S1, T0 TP-55 S2, T0 TP-55 S3, T0 TP-55 S5, foram obtidos e cultivados em meio MS0 (MURASHIGE E SKOOG, 1962) sólido (sais de MS 0,43%; i-inositol 0,005%; ácido nicotínico 0,1%; tiamina-HCl 1% pH 5,7) contendo timetin (100 mg.L⁻¹). Essas plantas foram clonadas e mantidas em magentas na cultura de tecidos antes de serem transferidas para o solo e levadas à casa-de-vegetação para produção de sementes. Um transformante independente, designado TP-55 AS5, contendo o gene *TP-55* na orientação anti-senso e sob o controle do promotor 35S, também foi obtido e usado como controle (dado não mostrado).

3.6. Diagnóstico molecular das plantas transgênicas

3.6.1. Extração do DNA genômico dos possíveis transformantes de *A. thaliana* e *N. tabacum*

Para a extração do DNA das plantas de arábido e tabaco, 100 mg de tecidos vegetais foram macerados em nitrogênio líquido usando cadinho e pistilo. O macerado foi homogeneizado com tampão de extração (Tris-HCl 0,2 M pH 7,5, NaCl 0,25 M, SDS 0,5% (p/v) e EDTA 0,025 M) e vortex por 5 segundos em temperatura ambiente. Em seguida, os debris celulares foram removidos por centrifugação a 20.000 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi precipitado com isopropanol 50% (v/v) por 10 minutos e

centrifugado a 20.000 x g por 6 minutos. O pellet foi lavado com etanol 75% (v/v), seco durante 5 minutos em speedvac e ressuspensionado em 50 μ L de água estéril. A integridade do DNA foi analisada em gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídeo 0,1 μ g/mL.

3.6.2. A reação de PCR (Polimerase Reaction Chain)

O DNA das plantas de *A. thaliana* e *N. tabacum* contendo as construções pK7-Anti e pK7F-Anti foram analisadas por PCR usando oligonucleotídeos específicos do gene *TP-55*, 4076-AntiF501 (CCATGCGCTGTTCTAGGATGG, coordenadas 539 a 559) e 4077-AntiR506 (GCCCAACTAGAGTCCCCTTCTC, posições 1042 a 1063) para a construção pK7-Anti, e os oligonucleotídeos 4076-AntiF501 e 4799-PK7FGFPRvs (CGCCCTCGCCCTCGCC GGACAC, específico do gene *GFP*) para a construção pK7F-Anti.

As plantas de *N. tabacum* transformadas com a construção pUFV408 também foram analisadas por PCR usando oligonucleotídeos que anelam em regiões específicas do gene que confere resistência a higromicina, presente no T-DNA do vetor pCambia 1301, cujas seqüências são 5'CGCTTCTGCGGGCGATTTGTGTACG3' (senso) e 5'TCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGG3' (anti-senso), assim como também utilizando os conjuntos de oligonucleotídeos específicos para *TP-55* descritos acima.

Na reação de PCR, foram utilizados 20 η g de DNA genômico da planta, 10 pmol dos oligonucleotídeos correspondentes, dNTPs 0,25 mM/L cada, 1 U de Taq Polimerase e tampão (MgCl₂ 2,0 mM, Tris-HCl 2,0 mM pH 8,4, KCl 50 mM) para um volume final de 25 μ L. As condições de reação adotadas consistiram de 3 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos (45 segundos a 94 °C, 1 minuto e 30 segundos a 55 °C e 2 minutos a 72 °C), seguindo 10 minutos a 72 °C. A reação de amplificação foi conduzida em um termociclador *MJ RESEARCH Peltier Thermal Cycler* PTC 2000 e os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) e corado com brometo de etídeo 0,1 μ g/mL.

3.7. Localização subcelular da proteína antiqutina em arabdopsis

Para verificar a localização da proteína TP-55 a nível celular, raízes de plantas de arabdopsis transformada com a construção pK7F-Anti foram cortadas utilizando micrótomo manual e montadas a fresco em lâminas para proceder a fotodocumentação. As imagens foram obtidas usando um microscópio de fluorescência *Olympus BX 60* com objetiva de 100x e excitação WU (cube U-MWU) com filtro de fluorescência, filtro de barreira BA 420 e espelho de dicroísmo DM400, capturadas usando um vídeo fotográfico CCD e a análise de imagem foi conduzida usando o software SXM 1.68 (RASBAND, 1997). A cor original das imagens foi convertida em TIFF, para uma escala de cinza, a qual varia em valores de zero a 255 e pseudocoloridas digitalmente com filtro de espectro colorido (CONTIM et al., 2003).

3.8. Análise da expressão do transgene

3.8.1 Extração de RNA total de *N. tabacum* transformados com a construção pUFV408

Para isolamento de RNA total dos transformantes de *N. tabacum* e da planta selvagem, 200 mg de tecido vegetal previamente macerado em nitrogênio líquido, foi homogeneizado com 1 mL do reagente TRIzol (SIGMA). Incubou-se a temperatura ambiente por 5 minutos e foi adicionada a mistura 0,2 mL clorofórmio. A mistura foi homogeneizada manualmente por 15 segundos, incubada à temperatura ambiente por 3 minutos e seguida por centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, livre de RNase, o RNA foi precipitado com 0,5 mL de isopropanol à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado a 12.000 g por 10 minutos. O RNA precipitado foi lavado com etanol 75% (v/v) (preparado com água livre de RNase) e centrifugado a 7.500 g por 10 minutos. Em seguida, o RNA foi seco à temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos, ressuspendido em 20 L de água livre de RNase e estocado a -80 °C.

A integridade do RNA total isolado foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X (Tris Base 0,089 M, Ácido Bórico 0,089 e EDTA 0,05 M pH 8,0), corado com brometo de etídeo 0,1 µg/mL.

3.8.2. RT-PCR

RNA total foi quantificado por espectrometria, absorvância de 260 nm, e a concentração do RNA total foi expressa em $\mu\text{g}/\text{L}$. A expressão do gene foi avaliada por RT-PCR utilizando *Kit* (INVITROGEN), onde se usou 25 μL do tampão 2X Reaction Mix, 1 μL de RT/ Taq Mix, 1 μL (10 μM) de cada um dos oligonucleotídeos (4076-AntiF501 e 4077-AntiR506) e 1 μg do RNA total como molde.

As condições de reação adotadas consistiram de 3 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos (45 segundos a 94 °C, 1 minuto e 30 segundos a 55 °C e 2 minutos a 72 °C), seguindo 10 minutos a 72 °C. A reação de amplificação foi conduzida em um termociclador *MJ RESEARCH Peltier Thermal Cycler PTC 2000* e os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) e corado com brometo de etídeo 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.9. Condições de estresses durante a germinação e em plântulas crescidas *in-vitro*

3.9.1. Ensaio de germinação em condições de estresse salino

Sementes das plantas de *N. tabacum* T0-TP-55-S2 e T0-TP-55-S3, (geração T0) e de plantas não transformadas foram esterilizadas com etanol 70 % (v/v) seguido de solução de hipoclorito 2%, e plaqueadas em meio MS0 sólido (MURASHIGE E SKOOK, 1962) contendo 0 mM; 100 mM; 150 mM e 200mM de NaCl, simulando estresse salino (HUANG et al., 2000). Cada tratamento consistiu de 5 repetições com 100 sementes plaqueadas em meio MS0 sólido. As placas foram mantidas a 28°C na presença de luz branca e após um mês de germinação, contou-se o número de sementes que germinaram em condições de estresse para cada conjunto de plantas. As análises foram realizadas avaliando a média do número de sementes germinadas dentro e entre os tratamentos. Além disso, foi realizado um teste de segregação para as sementes das plantas T0-TP-55-S2 e T0-TP-55-S3, crescendo essas sementes em meio MS0 sólido contendo as concentrações de NaCl referidas acima acrescido de higromicina na concentração de 50 mg/L. Também, para cada tratamento foram feitas 5 repetições com 100 sementes cada. Os resultados obtidos com o estresse salino foram analisados por ANOVA seguida do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, enquanto que os

dados obtidos com o ensaio de higromicina foram avaliados pelo teste de χ^2 ao nível de 5% de probabilidade, tomando-se como base o número total de sementes germinadas dentro de todos os tratamentos simultaneamente e em cada conjunto de tratamentos independentemente.

Também foi realizado o mesmo experimento para transformantes independentes de arabidopsis, pK7-Anti8 e pK7-Anti12 e a planta não transformada. Entretanto, o meio usado para plaquear arabidopsis foi MS sólido ½ força (MURASHIGE E SKOOK, 1962), e foram realizadas 4 repetições com 20 sementes cada. As placas de arabidopsis foram mantidas por 2 dias a 4 °C e 4 dias a 22 °C na presença de luz branca 2500-lux.

3.9.2. Estresse hídrico em plantas transformadas de tabaco

Sementes das plantas de tabaco não transformadas e dos transformantes independentes T1-TP-55-S2 e T1-TP-55-S3 foram esterilizadas [etanol 70% (v/v) e hipoclorito 2% (v/v)] e plaqueadas em meio MS0 sólido e após um mês de germinação, essas plantas foram mantidas em água por dois dias em copos de plásticos descartáveis envoltos por plásticos. Após o período de aclimação, essas plantas foram transferidas para vasos contendo terra mais substrato na proporção de 2:1 e mantidas sob condições controladas de luz e umidade relativa em casa de germinação. Após esse período de aclimação em casa-de-vegetação, cerca de duas semanas, essas plantas foram submetidas a estresse hídrico por meio de cessação de irrigação até o aparecimento evidente de murcha nas folhas.

3.9.3. Estresse oxidativo por H₂O₂ em sementes transgênicas de *N. tabacum* e *A. thaliana*

Cem sementes das plantas T0-TP-55-S2, T0-TP-55-S3, e tabaco controle, e 20 sementes das plantas de arabidopsis não transformada, pK7-Anti8 e pK7-Anti12 foram esterilizadas com etanol 70 % (v/v), seguido de solução de hipoclorito 2% (v/v), para as sementes de tabaco; e etanol 70%, triton 0,05% X-100 seguido de etanol 100% para as sementes de arabidopsis; e após a esterilização foram plaqueadas em duas camadas de

papel de filtro pré-hidratadas com água deionizada contendo 0 M, 10 M, 15 M e 20 M de H₂O₂ (SUNKAR et al., 2003). Cada tratamento consistiu de 3 repetições com 100 sementes plaqueadas para tabaco e 4 repetições com 20 sementes plaqueadas para arabidopsis. As placas de arabidopsis foram mantidas por 2 dias a 4 °C e 4 dias a 22 °C na presença de luz branca 2500-lux. As placas foram mantidas a 28 °C na presença de luz branca e após 15 dias, contou-se o número de sementes que germinaram em condições de estresse oxidativo para cada conjunto de plantas. As análises foram realizadas avaliando a média do número de sementes germinadas dentro e entre os tratamentos e o resultado obtido foi analisado por ANOVA seguida do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.9.4. Indução de dano oxidativo por paraquat e avaliação da clorofila

Discos foliares de 1,4 cm de diâmetro das plantas T1-TP-55-S2, T1-TP-55-S3 e plantas não transformadas de *N. tabacum* com 2 meses após a germinação foram incubados com 0 M, 1 M, 2 M e 4 M do herbicida paraquat (methyl viologen) (SIGMA) por 1 h de escuro seguidos de 18 h de iluminação constante de 200 mol.m⁻². sec⁻¹, à temperatura de 24 °C. Cada tratamento consistiu de 3 repetições com 3 discos foliares para cada uma das plantas. Em seguida, os discos foliares foram avaliados visualmente de acordo com a injúria referente ao branqueamento das folhas. Assim, foi medido o conteúdo de clorofila de forma indireta através da determinação da injúria no disco foliar provocada pelo tratamento com paraquat (BADAWI et al., 2004), utilizando o programa QUANT 1.0.1-R1 (VALE et al., 2003). A área injuriada foi desenhada em papel vegetal, scaneada e estimada pela técnica de medição de área, a partir da diferença entre a área total e a área não afetada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento do cDNA de soja, designado *GmTP-55*, pertencente à família ALDH7A1 de aldeídos desidrogenases

O cDNA *GmTP-55* (*Glycine max* Turgor Protein 55 kDa), também designado pUFV388, foi obtido de uma biblioteca de cDNA de sementes de soja submetida a déficit hídrico, contém um inserto de 1921 pb, que possui um quadro de leitura aberto com 510 aminoácidos, e codifica uma proteína com peso molecular de 55.562 e pI 5,27 (Figura 1). Uma análise da estrutura primária deduzida revelou a presença de um domínio conservado característico de desidrogenases (marcado em azul) e de um domínio hidrofóbico com 21 aminoácidos entre os aminoácidos 158 e 180 (região sublinhada) com probabilidade de ser um domínio transmembrana.

```
1      GAATTCGCGGCCGCTCGACTGGGTTTCAGGAAAAAGAAAACAGAAAACAATGGGTTCC
1      M G S
61     GATAATCACCAGAACTTGGAGTTCTTGAAGGAGATCGGTTTGGGCTCTTCCAACATTGGC
4      D N H Q N L E F L K E I G L G S S N I G
121    TCTTACATTAATGGCCAGTGGAAAGCCACTGGTTCTTCTGTCACTTCTGTTAATCCTTCT
24     S Y I N G Q W K A T G S S V T S V N P S
181    AACAATCAGAGTATAGCTCAAGTGAAGCAACTTTGCAAGATTTTGAGGAGGGGTTG
44     N N Q S I A Q V T E A T L Q D F E E G L
241    CGAGCTTGCAGTGAAGCAGCTAAGACATGGATGACTATAACCGGCACCGAAGAGAGGTGAG
64     R A C S E A A K T W M T I P A P K R G E
301    ATTGTGAGACAGATTGGTGAAGCATTGAGGGCCAAATTGGATCCTTTGGGTAGGCTGGTG
84     I V R Q I G E A L R A K L D P L G R L V
```

361 TCTCTTGAGATGGGAAAAATTCTCCCAGAAGGAATTGGGGAAGTTCAGGAAATTATTGAT
104 S L E M G K I L P E G I G E V Q E I I D
421 ATGTGTAATTATGGTGTGGGGCTAAGCAGACAATTGAATGGATCAATTATACCATCAGAA
124 M C N Y G V G L S R Q L N G S I I P S E
481 CGTCCAGATCATATGATGTTTTGAGGTATGGAACCCACTAGGAATAGTTGGTGTAAATCAGT
144 R P D H M M F E V W N P L G I V G V I S
541 GCTTTCAACTTTCCATGCGCTGTTCTAGGATGGAATGCTTGCATTGCTTTAGTCTGTGGT
164 A F N F P C A V L G W N A C I A L V C G
601 AACTGTGTTGTGTGGAAGGGTGTCCAACAACCTCTTTGATAACTATTGCTGTGACAAAG
184 N C V V W K G A P T T P L I T I A V T K
661 CTAGTAGCTGAAGTTCTTTGAGAGGAACAAATTACCTGGTGCATAATTCACCTCTTTCTGT
204 L V A E V L E R N K L P G A I F T S F C
721 GGAGGTGCTGACATTGGTCAGGCAATAGCAAAAAGACACTCGCATTCCCTGGTTTTCATTT
224 G G A D I G Q A I A K D T R I P L V S F
781 ACTGGAAGTTCAAAGGTTGGCTTGATGGTCCAGCAAACAGTTAATGAGAGATTTGGCAA
244 T G S S K V G L M V Q Q T V N E R F G K
841 TGCTTGCTTGAGTTAAGTGGAACAATGCAATAATTGTCATGGATGATGCAGACTCAAAT
264 C L L E L S G N N A I I V M D D A D S N
901 TGGCTGTACGTCTATTTTTGGTTGCTGCTGTGGGTCCACTGGTCAACCGGTGTACACTTGG
284 W L Y V Y F G C C C G S T G Q P V Y T W
961 CCTTGTGCTAGACTGTTTCTGCATGAAAATATTTATACAGACGTA TAGACCAACTTGT
304 P C R R L F L H E S I Y T D V L D Q L V
1021 GAAGTCTACAAACAAGTCAAAACTGGGAACCCCTTGGAGAAGGGGACTCTAGTTGGGCC
324 E V Y K Q V K T G N P L E K G T L V G P
1081 TTGCATACTCGTACTTCAGTAGAAAACCTTTCAGAAGGGTATTTTCAGTCATAAAATCTCAG
344 L H T R T S V E N F Q K G I S V I K S Q
1141 GGAGGGAAAATCCTAACCGGTGGATCTGTATTAGAGTCAGGAGGAAATTTGTACAACCA
364 G G K I L T G G S V L E S G G N F V Q P
1201 ACAATTGTTGAGATTTCTCCAGATGCTCCTGTAGTTAAAGAAGAATTGTTTGGTCCAGTT
384 T I V E I S P D A P V V K E E L F G P V
1261 CTGTATGTGATGAAATTTTCAGACTCTAGACGGAAGCAATTGCCTTGAACAATTTCTGTACCT
404 L Y V M K F Q T L D E A I A L N N S V P
1321 CAAGGATTAAGTAGTTCAATCTTTACCCAAAGACCTGGAACATATTTCAAATGGATCGGG
424 Q G L S S S I F T Q R P G T I F K W I G
1381 CCACGAGGTAGTGATTGTGGTATAGTGAATGCAAACATACCTACAAATGGAGCTGAAATT
444 P R G S D C G I V N A N I P T N G A E I
1441 GGTGGTGCCTTTGGTGGAGAAAAGGCCACAGGTGGTGGCCGTGAAGCGGGAAGTGACTCA
464 G G A F G G E K A T G G G R E A G S D S
1501 TGGAAGCAATACATGCGGCGTTCTACATGTACCATCAATTATGGAAGTGAACCTACCATTA
484 W K Q Y M R R S T C T I N Y G S E L P L
1561 GCTCAGGGGATAAACTTTGGCTAGAAAAGCTATCCTAGCACATGAGGCTGCACAAAATAAT
510 A Q G I N F G *
1621 GCGATTTTGCAGTCTGAAGAGAGTTCTATATATACCGAGATGTTAGTCTGGCTTGACATG
1681 GGTTCAAAGTGTTGTCTTAACAAGACATGCTTGGCTGTAAGGATGGCACCTTGATATGACA
1741 GTTTCAATGTATAAGATATCTTAAATAAATGTTAAATGAATAAGCTGGAATTCCTTTTCC
1801 CAGTCAAAAAGTGTGTTGATGTTTAAATTCGTGTTTTGTGATTTTGGCCATTGAAAAATA
1861 ATGTATGCATGTATTTCATTGCTATAAAAAATTTATTCTTTTTAGACTTAAAAGTCGACGC
1921 GGCCGCAATTC

Figura 1 - Sequência de nucleotídeos e aminoácidos do clone pUFV388, o qual codifica para a proteína TP-55 (turgor protein). Os aminoácidos destacados em azul representam um domínio característico de desidrogenases, e a sequência sublinhada, entre os aminoácidos 158 e 180, uma possível região transmembrana.

As enzimas do tipo aldeído desidrogenases possuem uma seqüência consenso de aminoácidos (VTLELGGKS), apresentando um resíduo de cisteína após 28 resíduos de aminoácidos dessa seqüência conservada (GUERRERO et al., 1990). A proteína TP-55 possui essa seqüência pouco conservada (TLELSGNN), entretanto ela possui o resíduo de cisteína localizado nessa mesma posição, semelhante ao que foi encontrado em análise de seqüência para a proteína homóloga 26g de ervilha (GUERRERO et al., 1990), e para a proteína antiquitina de humanos (STROEHER, et al., 1995; PEROZICH, et al., 1999a).

A seqüência da proteína TP-55 foi identificada no GeneBank com o número de acesso AY250704, e comparando essa proteína com seqüências de ESTs (Expression Sequence Tagging), descobriu-se alta similaridade, 82% de homologia, com a proteína 26g de ervilha (*P.sativum*), a qual é expressa e acumulada no caule sob condições de estresse hídrico (GUERRERO et al., 1990). A análise comparativa entre seqüências de aminoácidos com membros da superfamília de aldeído desidrogenases demonstrou que o gene *GmTP-55* é provavelmente um membro da família ALDH7A1 que contém os homólogos da antiquitina em vários organismos como mamíferos, peixes e plantas (Figura 2).

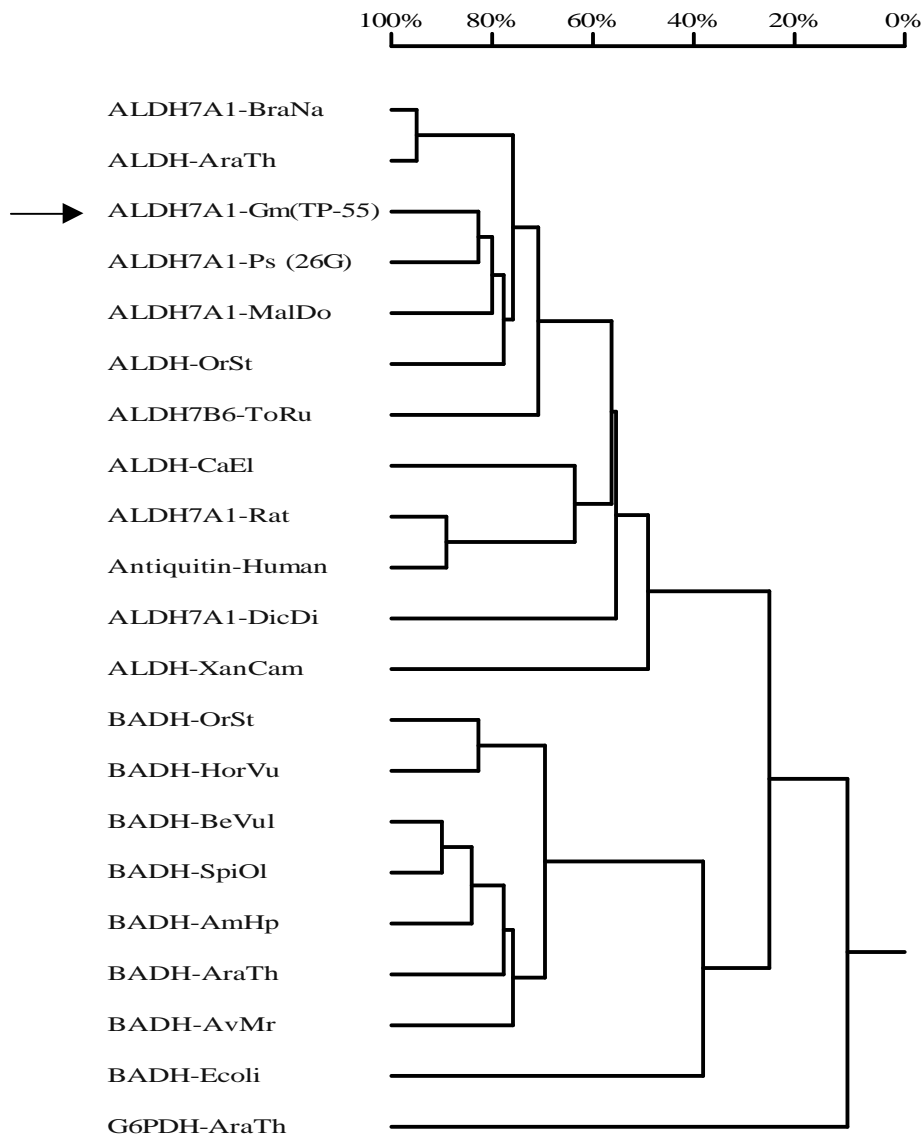


Figura 2 - Agrupamento com base em similaridade de seqüências de aminoácidos das proteínas aldeído desidrogenases obtidas no GeneBank, e alinhadas no programa DNAMAN 4.0 software, permitindo a construção da árvore acima. A seta indica a posição do homólogo da proteína antiquitina *Glycine max* (GmTP-55, AY250704). As seqüências utilizadas para a construção da árvore filogenética com seus respectivos números de acesso foram: AAK59375 (AldhBriof), AAM13853 (AlddhAt), S53503 (Btg-26), Q9ZPB7 (MF-60), AF323586 (ORST-Fungo Induced), NP_498263 (AldhCael), BE626428 (AldhMouse), P49419 (Antiquitin), P25795 (26g), AAM33708 (AldhDictds), NP_420030 (AldhProteobct), NP_523150 (AldhRsts), NP_642135 (AldhXamth), O04895 (BADHAmHp), AAN52929 (BADHSpnc), X58462 (BvglSaltInd), Q9S795 (BADHAt), AAK55121 (BADHAvM), CAC48392 (BADHPst), BM893377 (BADHsoyb), O24174 (BADHOrStPrx), AAL05264 (BADHTricsest), NP_373137 (GlcBtnStpcars), S15181 (BADHEcoli), AAN72144 (G6PDAt).

Os homólogos da TP-55 descritos na literatura atuam nos processos de regulação osmótica, como por exemplo, a *Aldh2a* uma desidrogenase de arroz que tem sua expressão aumentada em condições anaeróbicas, sugerindo que o estresse provocado devido à reduzida concentração de oxigênio é regulado pela elevação dos níveis de Ca^{+2} citosólico (NAKAZONO et al., 2000). A proteína 26g de ervilha (*P. sativum*) tem sua expressão aumentada em consequência do desequilíbrio osmótico ocasionado por déficit hídrico (GUERRERO et al., 1990); enquanto que a proteína antiquitina de humanos é encontrada principalmente nos rins e no ouvido, os quais são órgãos relacionados com a osmorregulação (VASILIOU et al., 2000). O alto nível de conservação entre os homólogos de antiquitinas em organismos filogeneticamente distantes sugere que estas enzimas devam participar de uma rota metabólica alternativa e conservada, provavelmente ativa durante o ajustamento osmótico.

4.2. Superexpressão da proteína TP-55 quimérica

Com a finalidade de analisar o acúmulo da proteína TP-55 em extratos protéicos de planta de soja, anticorpos policlonais foram produzidos contra a proteína recombinante. Assim sendo, a proteína TP-55 foi expressa em *E. coli* como proteína quimérica fusionada a uma extensão de 24 histidinas na região amino terminal, sendo esse clone denominado de pUFV458. A indução da proteína TP-55 em *E. coli* DH5 com IPTG resultou em acúmulo predominante da proteína recombinante na fração insolúvel do extrato protéico da bactéria transformada e induzida (Figura 3A, canaleta FI).

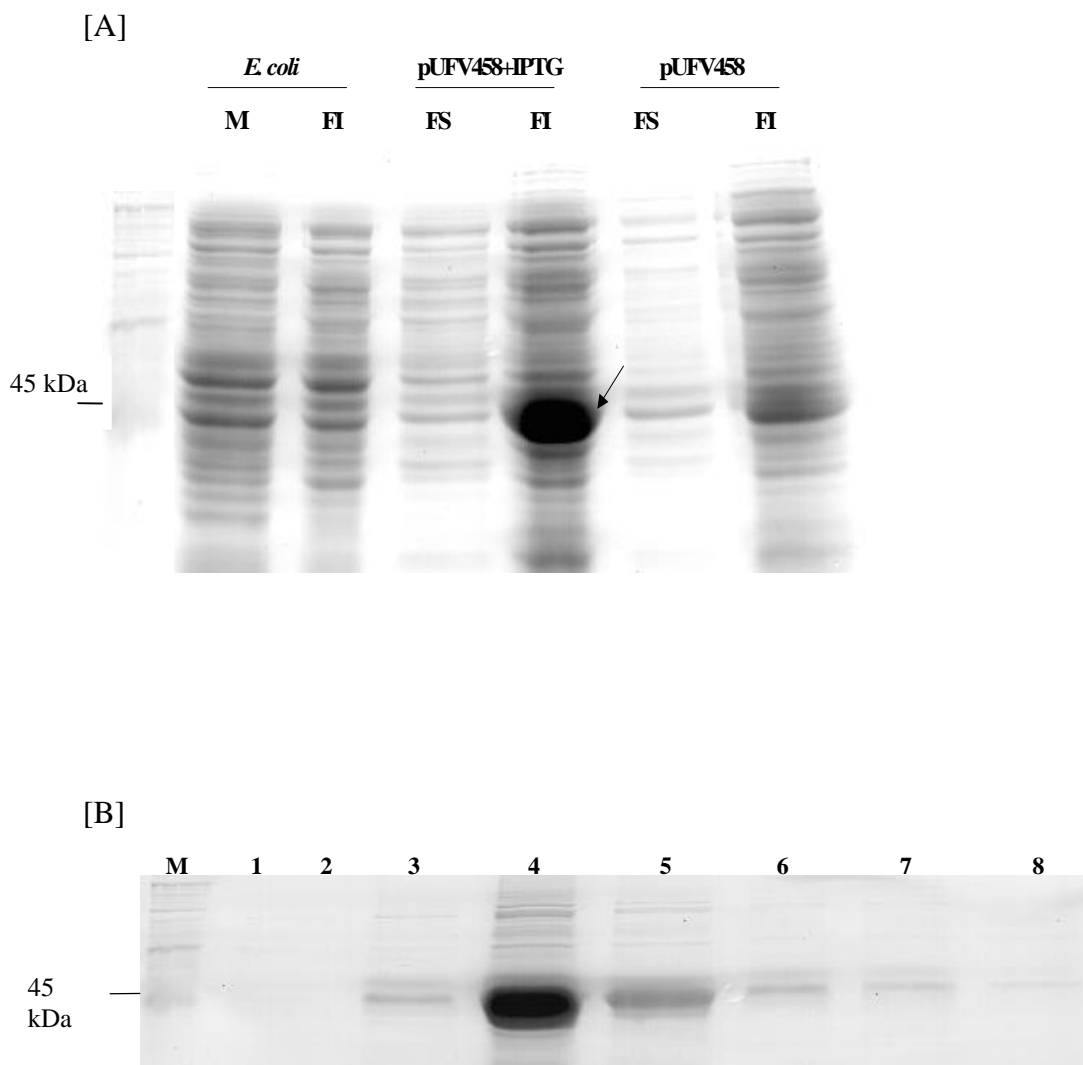


Figura 3 - Indução e purificação da proteína TP-55 utilizando *E. coli* DH5 transformadas com o clone pUFV458. [A] Fracionamento em SDS-PAGE e coloração com “cromassie brillant blue R-250” da indução da proteína TP-55. *E. coli* e pUFV458 sem IPTG são controles negativos. FS e FI significam frações da proteína solúvel e insolúvel, respectivamente. M representa o marcador *broad range* da BIORAD. [B] Purificação da proteína TP-55. A proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade ao Ni^{2+} , fracionada em SDS-PAGE e corada com “coomassie brillant blue R-250”. As colunas numeradas de 1 a 8 são as frações eluídas da coluna de afinidade. M representa o marcador *broad range* da BIORAD.

A proteína TP-55 foi purificada por cromatografia de afinidade em resina de Ni²⁺ a partir das frações insolúveis de extrato bacteriano induzido com IPTG. As frações eluídas contendo a proteína recombinante foram identificadas por SDS-PAGE (Figura 3b), reunidas e utilizadas para imunizar coelho. As coletas de anti-soro foram tituladas através de *dot-blot*, e o anti-soro que apresentou melhor título foi utilizado na detecção do homólogo da proteína antiquitina em extratos protéicos.

O anticorpo policlonal foi purificado por cromatografia de afinidade em resina de proteína A, a qual possui afinidade pela fração IgGs do antisoro, que é responsável pela resposta específica ao antígeno, eliminando assim as imunoglobulinas inespecíficas, tais como as das subclasses IgM, IgA, IgD e IgE.

4.3. Indução da proteína TP-55 em plantas de soja submetidas a estresses hídrico e salino

Em geral, aldeído desidrogenases pertencentes à família ALDH7A1 são classificadas como proteínas de estresse, devido serem induzidas por estresse osmótico (KIRCH et al. 2004). Assim sendo, o acúmulo da proteína TP-55 foi investigado em diferentes órgãos de soja, sob condições normais e condições de déficit hídrico e estresse salino. Para indução de estresse salino plantas de soja var. BR16 foram irrigadas com solução 300 mM NaCl e 600 mM NaCl, enquanto que o déficit hídrico foi induzido por meio de suspensão de irrigação até o aparecimento de murcha. Em condições normais, a proteína TP-55 apresentou acúmulo em baixos níveis nos extratos de raízes e caules, não sendo detectada nos extratos foliares (Figuras 4A e 4B).

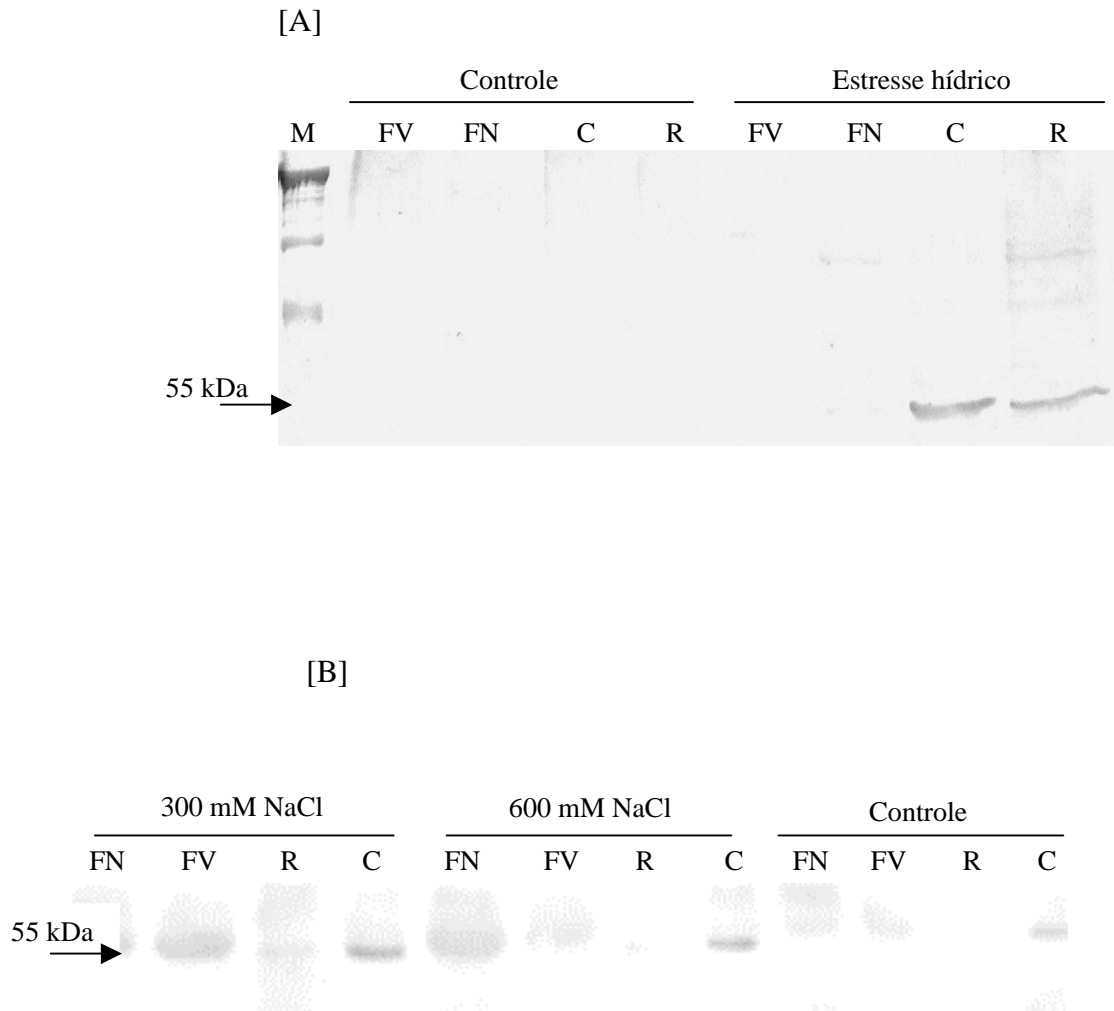


Figura 4 - *Immunoblotting* das proteínas totais de diferentes tecidos da soja var. BR16 sob condições normais, déficit hídrico e estresse salino. As proteínas foram separadas em SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas contra o soro Anti-TP55. [A] Déficit hídrico. [B] Estresse salino. M corresponde o marcador *Low-range* da BIORAD, FV é folha velha, FN é folha nova, C é caule e R é raiz.

Embora o aumento no tempo de revelação do *immunoblotting* tenha provocado o aparecimento de reações cruzadas de proteínas de massa molecular aproximado a 55000 nas folhas, a mobilidade eletroforética das proteínas foliares reveladas foi ligeiramente superior à proteína TP-55 (Figura 4B). Provavelmente, este resultado reflete reações inespecíficas do anticorpo com a subunidade maior da RUBISCO, uma vez que possui peso molecular similar a TP-55 e acumula em altas concentrações nas folhas. A integridade dos extratos de proteína total foi monitorado por SDS-PAGE (dado não mostrado).

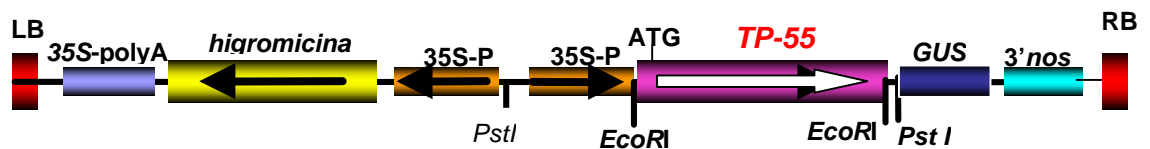
A indução de déficit hídrico em plantas de soja provoca um aumento acentuado do acúmulo da proteína TP-55 em caule e raiz (Figura 4A). Similarmente, tratamento com 300 mM NaCl ou 600 mM NaCl resulta em indução da proteína TP-55 em caules e raízes (Figura 4B). Entretanto, em condições de estresses hídrico e salino, a indução da proteína ocorre predominantemente no caule. Estes resultados indicam que embora a proteína TP-55 seja detectada tanto em caules como em raízes, acumula predominantemente em caules estressados, tanto em condições de déficit hídrico quanto em condições de estresse salino. Este resultado sugere que a proteína TP-55 possa desempenhar função de osmoproteção, atuando numa rota metabólica alternativa para promover o equilíbrio osmótico celular. De fato, as células meristemáticas e parenquimáticas no caule devem se ajustar de modo a receber água através do processo de difusão, isto é, transporte célula-célula, por isso há a necessidade de ajustarem suas concentrações de solutos citoplasmáticos. Por outro lado, os tecidos foliares acumulam os fotoassimilados que auxiliam no ajustamento osmótico da célula, não havendo necessidade de sintetizar ácidos orgânicos compatíveis.

No caso do meristema da raiz, o ajustamento osmótico pode ser o resultado de dois mecanismos globais: um aumento na taxa líquida de deposição osmótica, o qual é mais provável de representar uma resposta adaptável que poderia contribuir para manutenção de crescimento; ou uma diminuição na taxa de expansão de tecido e, então, na taxa de diluição osmótica (SHARP et al., 2004). O ajustamento osmótico nessa zona de crescimento ocorre primeiramente pelo acúmulo de hexoses, e também de prolina que é drasticamente aumentada em raízes estressadas, contribuindo para o ajustamento osmótico. Entretanto, os demais solutos que também respondem no ajustamento osmótico em raízes estressadas permanecem por ser identificados (VOETBERG E SHARP, 1991; VERSLUES E SHARP, 1999; SHARP et al. 2004).

4.4. Obtenção e análise molecular das plantas transgênicas

O cDNA que codifica a proteína TP-55 foi transferido para o vetor de expressão em plantas pCambia 1301Z, ficando sob o controle do promotor 35S do CaMV (Figura 5A). Esta construção foi usada para transformar tabaco via *Agrobacterium tumefaciens*.

[A]



[B]

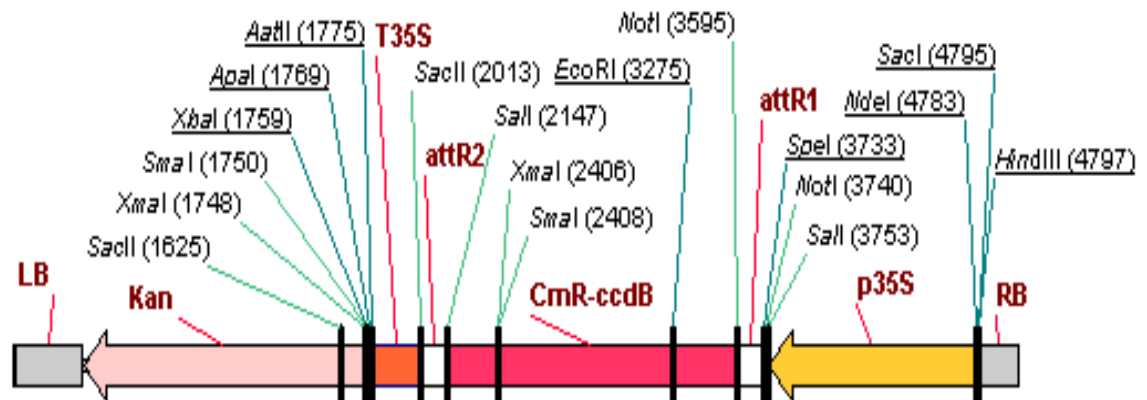


Figura 5 - Diagrama esquemático da construção quimérica do homólogo da antiqitina de soja, TP-55, usadas para transformar *N. tabacum* (A) e *A. thaliana*. (B). Em A, o cDNA de TP-55 foi inserido no sentido senso no vetor de expressão em plantas, pCambia 1301Z, obtendo-se o clone pUFV408. A expressão do gene de *hyg* (higromicina) está sob o controle do promotor 35S. [B] A sequência da TP-55 foi inserida no vetor pK7WG2 por recombinação obtendo-se o clone pK7-Anti e em pK7WFG2, resultando em pK7F-Anti, nos quais o cDNA de TP-55 substituiu o gene *CmR-ccdB*. Kan representa o gene *nptII* que confere resistência a kanamicina. Nas três construções, o cDNA que codifica para a proteína TP-55 encontra-se sob o controle do promotor 35S do CaMV. LB e RB correspondem às bordas esquerda e direita do T-DNA. As posições de alguns sítios de restrição são indicadas.

Os transformantes primários (T0) foram selecionados com base em sua resistência à higromicina, e o diagnóstico das plantas transgênicas foi realizado por PCR (Polimerase Reaction Chain), usando oligonucleotídeos específicos para o gene *hgr* presente no T-DNA do vetor pCambia 1301Z (Figura 6A). A incorporação do gene *hgr* foi confirmada em pelo menos quatro transformantes independentes de tabaco T0 (T0 TP-55 S1, T0 TP-55 S2, T0 TP-55 S3, T0 TP-55 S5), pela amplificação do fragmento de 500bp a partir dos respectivos DNA genômicos. Similarmente, a incorporação do gene *TP-55* foi determinada por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos que amplificaram um fragmento do tamanho esperado de aproximadamente 500pb, a partir de DNA dos quatro transformantes primários, mas não de plantas controle e vetor pCambia (Figura 6B).

Após a confirmação desses clones e de observações fenotípicas desses quatro transformantes independentes de tabaco, os transformantes T0 TP-55 S2 e T0 TP-55 S3 foram selecionados para a produção de sementes em casa de vegetação e para as análises funcionais do gene *TP-55* subsequentes.

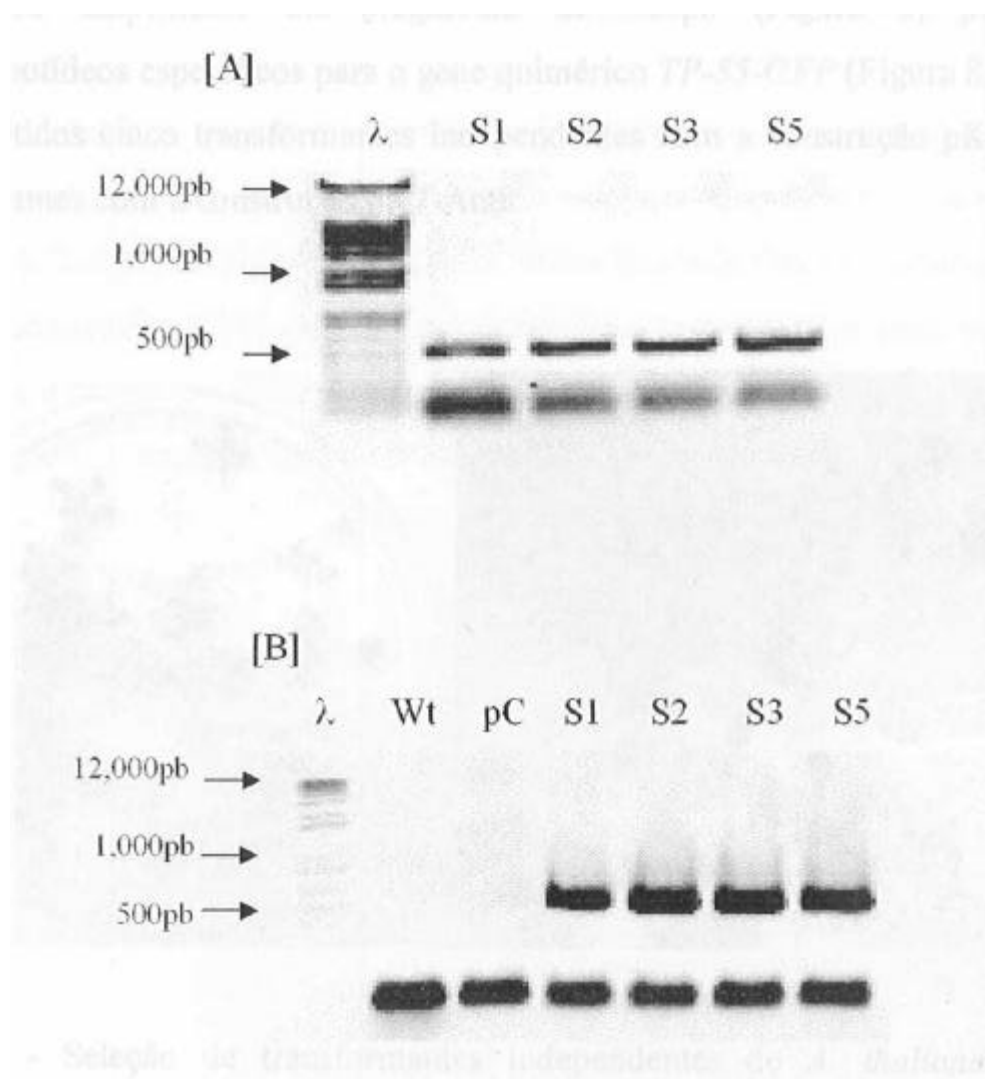


Figura 6 - Diagnóstico dos transformantes independentes de tabaco contendo gene *TP-55*. [A] Confirmação dos clones por “PCR”, utilizando os oligonucleotídeos específicos para o gene da higromicina, e em [B] a confirmação dos transformantes foi feita utilizando os primers 4076F e 4077R, específicos para uma região interna do cDNA da *TP-55*. (λ) padrão em pares de bases; (Wt) planta de *N. tabacum* selvagem; (pC) planta de *N. tabacum* transformada com o vetor pCambia 1301Z e (S1, S2, S3 e S5) são transformantes independentes de *N. tabacum*.

Para transformação de arábida, foram utilizadas as construções pK7–Anti e pK7F–Anti separadamente. Em ambas as construções o cDNA de *TP-55* está sob o controle do promotor 35S, sendo que em pK7F–Anti, o gene *TP-55* está fusionado a *GFP* (Figura 5B). As sementes T1 foram germinadas em meio seletivo MS meia força para a seleção dos possíveis transformantes independentes (Figura 7), cuja incorporação do gene *TP-55* foi confirmada por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para

do gene *TP-55* foi confirmada por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para *TP-55* que amplificam um fragmento de 500pb (Figura 8, pK7-Anti) ou oligonucleotídeos específicos para o gene quimérico *TP-55-GFP* (Figura 8, pK7F-Anti). Foram obtidos cinco transformantes independentes com a construção pK7F-Anti e 13 transformantes com a construção pK7-Anti.

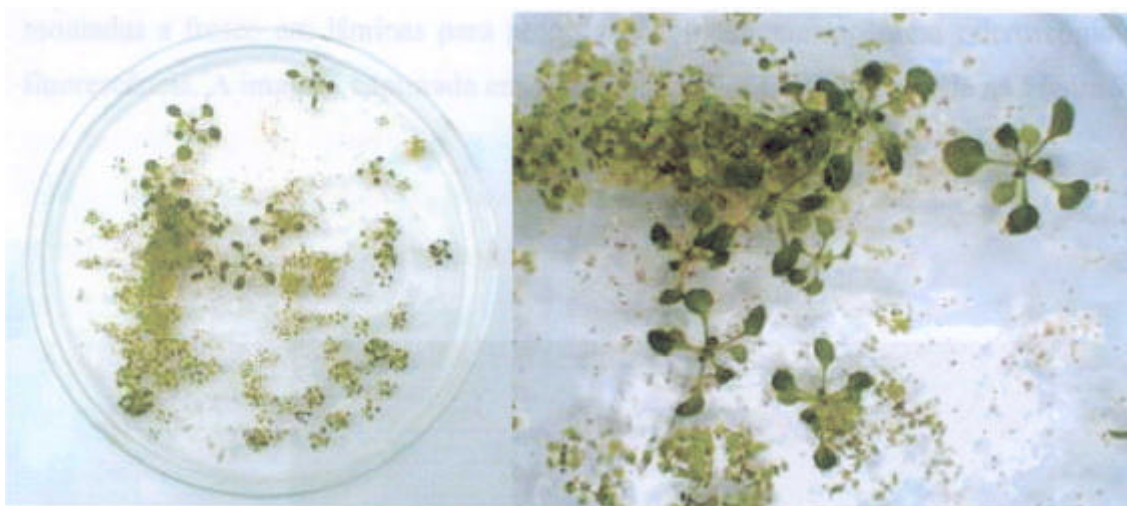


Figura 7 - Seleção de transformantes independentes de *A. thaliana* contendo a construção pK7-Anti e pK7F-Anti. Os transformantes primários foram selecionados, após um mês de germinação em meio MS meia força, contendo kanamicina.

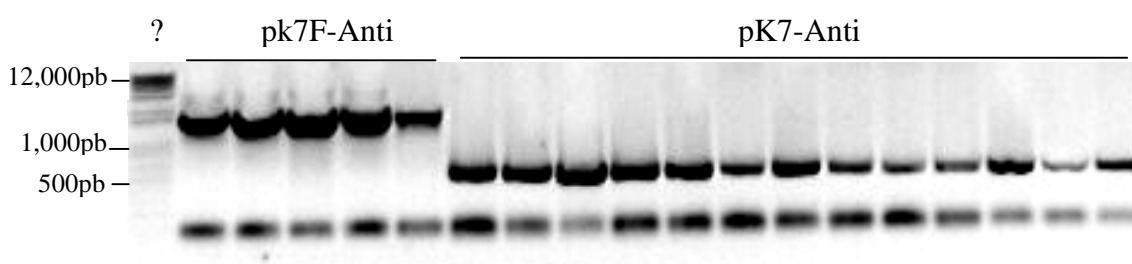


Figura 8 - Diagnóstico dos transformantes independentes de *Arabidopsis* contendo os clones pK7-Anti e pK7F-Anti. A confirmação da integração da construção pk7F-Anti foi feita por meio de “PCR”, utilizando os iniciadores 4076F e 4799R específicos para o gene quimérico *TP-55-GFP*, e para a construção pK7-Anti, foram utilizados os iniciadores 4076F e 4077R, específicos para o gene *TP-55*. (λ) padrão em pares de bases. Cada canaleta representa o resultado da amplificação do DNA de transformantes independentes.

4.5. Determinação subcelular da proteína antiqitina em arabdopsis

A existência de um domínio hidrofóbico na região central da proteína TP-55 sugere uma possível localização da proteína em membranas. Para identificar a localização subcelular da proteína TP-55, raízes de plantas de arabidopsis transformadas com a construção pK7F-Anti foram coletadas, cortadas com micrótomo manual e montadas a fresco em lâminas para proceder a fotodocumentação em microscópio de fluorescência. A imagem capturada em vídeo fotográfico CCD é mostrada na Figura 9.

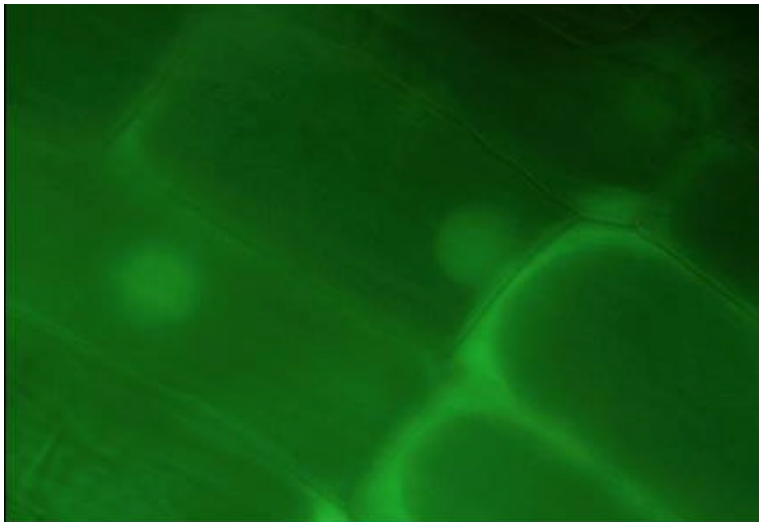


Figura 9 - Localização sub-celular da proteína quimérica TP-55-GFP. Fotodocumentação obtida em microscópio de fluorescência de raiz de arabidopsis transformada com a construção pK7F-Anti, onde o gene quimérico *TP-55-GFP* encontra-se sob o controle do promotor constitutivo 35S do CaMV.

O resultado da microscopia de fluorescência mostra algumas células de raiz, visualizando intensa fluorescência no citoplasma e no núcleo dessas células. Este resultado sugere que a proteína TP-55 é localizada em dois compartimentos sub-celulares distintos. Entretanto, a análise da estrutura primária deduzida de TP-55 identificou a presença de uma seqüência hidrofóbica na região central da proteína que poderia funcionar com um segmento transmembrana, e também inexistência de sinal de localização nuclear. Portanto, o acúmulo dessa proteína em condições normais no núcleo de células vegetais, pode ser resultado de sua associação à uma proteína nuclear que redirecionaria o transporte de TP-55 para o núcleo. Inúmeros precedentes na literatura têm sido descritos, demonstrando que proteínas citoplasmáticas são direcionadas para o núcleo quando associam de uma maneira regulatória com proteínas nucleares (KEEGSTRA E CLINE, 1999). Entretanto, para uma interpretação conclusiva desses resultados é necessário demonstrar que a proteína quimérica *TP-55-GFP* é funcional e, portanto, é capaz de dobrar corretamente na célula vegetal. Além disso, torna-se necessário identificar a localização dessa proteína tanto em condições normais como em condições de estresses que induzem o acúmulo de TP-55.

4.6. Análise da expressão do transgene

Uma análise da expressão do transgene foi conduzida por RT-PCR não quantitativo, a partir de cDNA preparado de RNA total extraído das linhagens transformadas (Figura 10A). Os oligonucleotídeos específicos para o gene *TP-55* amplificaram um fragmento do tamanho esperado de 500 bp a partir de cDNA preparado das quatro linhagens transgênicas de *N. tabacum* (Figure 10B), mas não a partir de cDNA de tabaco não transformado.

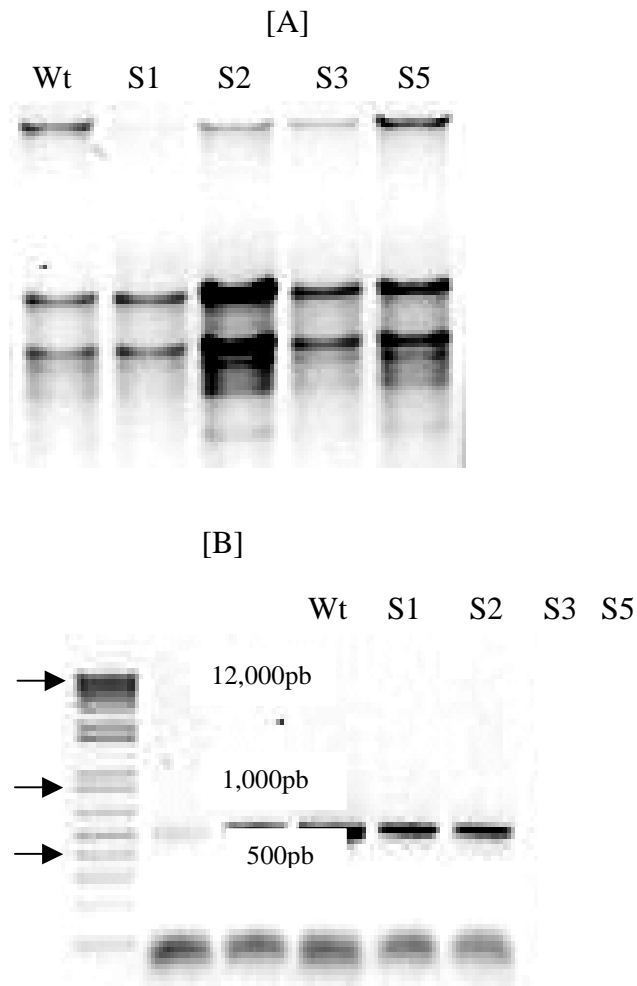


Figura 10 - Análise da expressão do transgene em tabacos transformados. [A] Eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídeo, mostrando a extração de RNA total dos transformantes independentes T0 TP-55 S1 (S1), T0 TP-55 S2 (S2), T0 TP-55 S3 (S3), T0 TP-55 S5 (S5) assim como também da planta controle não transformada (Wt). [B] Acúmulo de mRNA de *TP-55* em plantas transformadas. Os ensaios de RT-PCR foram conduzidos com o cDNA preparado das linhagens transformadas e de plantas controle, utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene *GmTP-55*. () representa o marcador de peso molecular lambda.

Um homólogo do gene *TP-55* foi identificado em *A. thaliana* e ervilha (STROEHER et al., 1995; BRAY, 2004) e provavelmente também existe em *N. tabacum*, embora não tenha sido detectado em plantas normais de tabaco por RT-PCR. Os oligonucleotídeos utilizados são específicos para o gene *GmTP-55* e podem não reconhecer o gene homólogo de tabaco. Alternativamente ou adicionalmente, o mRNA do gene endógeno de tabaco acumula-se em baixas concentrações em condições normais de crescimento e, conseqüentemente, o resultado de RT-PCR não descarta a possibilidade de que o gene homólogo de tabaco possa ser induzido na planta não transformada em condições de estresse hídrico.

Sabe-se que o acúmulo de mRNAs dos genes induzidos por estresse hídrico diminui quando as plantas são liberadas das condições de estresse, os quais são consistentes com evidências que mostram que esses genes respondem ao estresse hídrico ou desidratação. Acredita-se que a indução da expressão gênica por estresse hídrico constitua evidência de que o acúmulo de mRNAs induzidos sob tais condições promova um aumento de tolerância do vegetal a déficit hídrico. A função do produto desses genes tem sido predita por meio de comparação de seqüências homólogas com proteínas conhecidas e acredita-se possuírem um papel na proteção da célula diante do estresse hídrico (INGRAM E BARTELS, 1996; BRAY, 1997).

4.7. Expressão do gene *TP-55* em *N. tabacum* e *A. thaliana* aumentam tolerância das plantas transgênicas a estresse salino

4.7.1. Ensaio de germinação com sementes transgênicas de *N. tabacum*

Após a análise molecular e da observação dos fenótipos das plantas de tabaco transformadas, os transformantes independentes T0 TP-55 S2 e T0 TP-55 S3 foram selecionados para a obtenção de sementes e prosseguir com os estudos funcionais, já que os transformantes T0 TP-55 S1 e T0 TP-55 S5 apresentam folhas finas, curtas e enroladas. O efeito da expressão do gene *TP-55* sob condições de estresse salino foi analisado em um ensaio de germinação utilizando sementes das plantas transgênicas, T0 TP-55 S2 e T0 TP-55 S3, e sementes da planta não transformada. Esse ensaio consistiu no plaqueamento de 100 sementes dos transformantes T0 TP-55 S2 e T0 TP-55 S3, da

geração T0, e 100 sementes de *N. tabacum* não transformada em meio MS0 sólido contendo concentrações crescentes de NaCl, simulando estresse salino (HUANG et al., 2000). O fenótipo das plântulas T1 TP-55 S2 resultantes do ensaio de germinação pode ser visualizado na Figura 11, demonstrando que as plantas transgênicas exibiram maior tolerância a estresse salino durante a germinação. Resultados similares foram obtidos para as sementes transgênicas T1 TP-55 S3 (dados não mostrados).

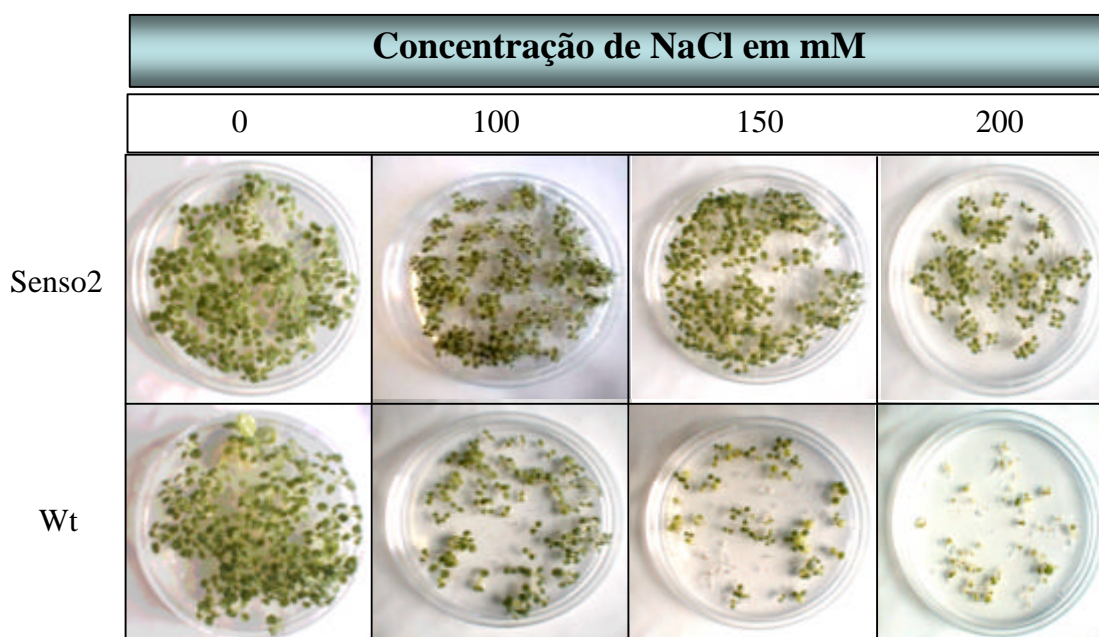


Figura 11 - Fenótipo resultante do ensaio de germinação um mês após o plaqueamento das sementes. Sementes do transformante independente T1 TP-55 S2 (Senso 2) e da planta não transformada (Wt) de *N. tabacum* foram plaqueadas em meio contendo 0 mM; 100 mM; 150 mM e 200mM de NaCl.

A análise estatística dos dados de germinação (Anexo I) considerou para efeito de cálculo as plantas, após um mês de germinação, que apresentaram folhas bem desenvolvida, dentro de cada tratamento (Figura 12), e revelou que tanto o transformante independente T1 TP-55 S2 quanto o T1 TP-55 S3 apresentaram maior tolerância a germinação em condições de estresse salino quando comparadas as plantas

controles. Enquanto que somente 45% das sementes controle germinaram em plântulas na presença de NaCl 200mM, as sementes T1 TP-55 S2 germinaram com alta eficiência nestas condições (mais do que 90% das sementes S2 germinaram). Embora o nível de tolerância a estresse salino das sementes T1 TP-55 S3 foi menor do que aquele apresentado pelas sementes T1 TP-55 S2, a eficiência de germinação das sementes T1 TP-55 S3 na presença de NaCl foi superior quando comparado às sementes controle. De fato, enquanto que as sementes controles tiveram uma redução de aproximadamente 20% na eficiência de germinação na concentração de 150 mM de NaCl, as sementes T1 TP-55 S3 mantiveram uma eficiência de germinação de 100% nestas condições de sal. Mesmo a concentração de NaCl de 200 mM, a eficiência de germinação das sementes T1 TP-55 S3 (58%) foi ligeiramente superior aquela das sementes controle (45%).

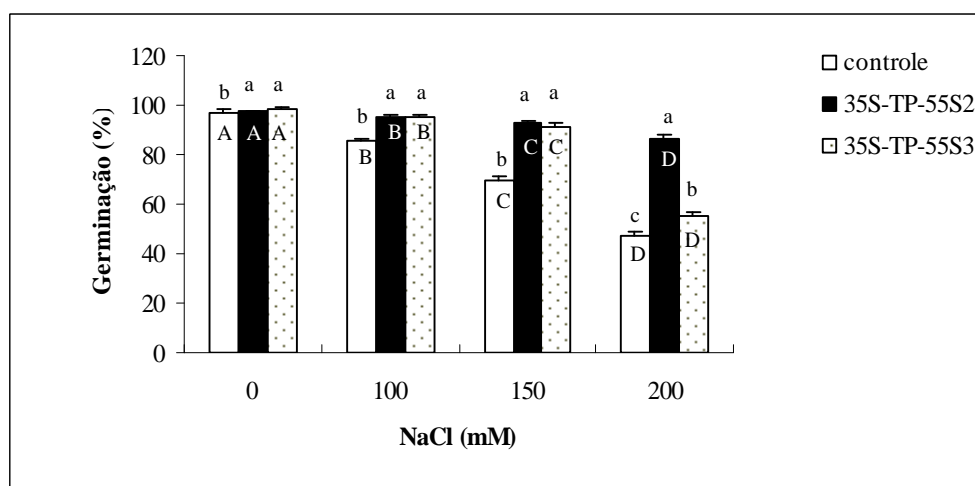


Figura 12 - Resultado do ensaio de germinação. A média de sementes germinadas de tabaco entre os tratamentos testados (0 M NaCl, 0,1M NaCl, 0,15 M NaCl e 0,2 M NaCl) foi analisada por ANOVA seguido de Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), utilizando o programa ESTATÍSTICA AX 5.0, o qual relatou diferença significativa entre as médias dos tratamentos. Os dados apresentados constituem a média com o desvio padrão de cinco repetições de cada transformante independente. As comparações de médias entre os tratamentos são indicadas por letra maiúscula, enquanto que as comparações de médias dentro de cada tratamento são indicadas por letra minúscula. Letras diferentes indicam diferenças significativas

Além disso, foi realizado um teste de segregação para as sementes T1 TP-55 S2 e T1 TP-55 S3, crescendo essas em meio MS0 sólido acrescido de higromicina contendo as mesmas concentrações de NaCl já relatadas. A Figura 13 mostra o fenótipo observado das plantas T1 TP-55 S2 germinadas e usadas para a análise de segregação.

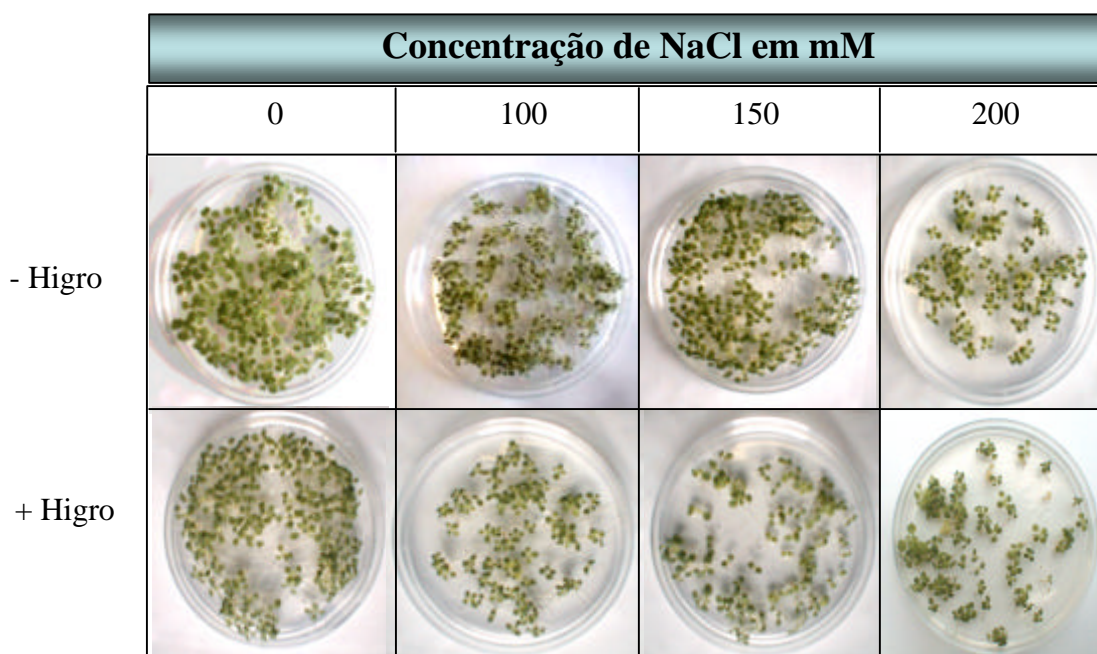


Figura 13 - Análise de segregação do transformante independente de tabaco T1 TP-55 S2, um mês após a germinação. As sementes transgênicas foram plaqueadas em meio contendo 0 mM; 100 mM; 150 mM e 200mM de NaCl, sem higromicina (-Higo) e com higromicina (+Higo).

Para cada um dos tratamentos foram feitas 5 repetições com 100 sementes, sendo as placas mantidas em condições de cultura de tecidos. Após um mês de germinação, contou-se o número de sementes que germinaram em cada conjunto de experimentos. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos com a análise de segregação do gene *TP-55* dos transgenes T1 TP-55 S2 e T1 TP-55 S3. Os dados obtidos com o ensaio de higromicina foram avaliados pelo teste de χ^2 ao nível de 5% de probabilidade tomando-se como base o número total de sementes germinadas dentro de todos os tratamentos simultaneamente e em cada conjunto de tratamentos independentemente.

Tabela 1. Expressão de tolerância a higromicina e estresse salino na geração T1 de plantas transgênicas de tabaco.

Linhasgens de plantas testadas	Resistência a Higromicina (<i>hgr</i>)	Tolerância a estresse 0,1 mM NaCl		Tolerância a estresse 0,2 mM NaCl	
		Razão	χ^2	Razão	χ^2
35S-TP55S2	1377 ⁺ /486 ⁻	3:1	1,23	353 ⁺ /123 ⁻	3:1 0,179
35S-TP55S3	1244 ⁺ /455 ⁻	3:1	2,87	365 ⁺ /110 ⁻	3:1 0,859
Control ^b	003 ⁺ /997 ⁻	—	—	ND ^a	— —

^a ND, Não determinado

^b Não transformadas, plantas selvagens

Teste χ^2 indica bom grau de taxa de segregação como indicado

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram a análise de segregação dos transformantes independentes senso2 (35S-TP55S2) e senso3 (35S-TP55S3). Estes resultados de segregação demonstraram que o fenótipo de tolerância a estresse salino a 100 mM NaCl e 200 mM NaCl segrega na mesma razão e, portanto, está ligado ao gene *hgr* do T-DNA que confere resistência a higromicina. Como sementes de tabacos transformados somente com gene para a higromicina não são tolerantes à estresse salino durante a germinação, conclui-se geneticamente que o fenótipo de tolerância apresentado pela germinação de sementes transgênicas em presença de estresse salino é devido a expressão do transgene *TP-55*.

4.7.2. Ensaio de germinação com sementes transgênicas de *A. thaliana*

De modo semelhante ao ensaio de germinação feito para os transformantes de tabaco, foi realizado um experimento com os transformantes independentes de *A. thaliana*, pK7-Anti8 e pK7-Anti12 (T3), e a linhagem Col-0 não transformada. Entretanto, o meio usado para plaquear arábido foi o MS ½ força, tendo sido realizada 4 repetições com 20 sementes cada. As plantas de arábido foram mantidas por 2 dias a 4 °C e após 15 dias de germinação, as sementes germinadas que apresentavam folha ou somente radícula foram consideradas para os cálculos (ANEXO 2). Os resultados obtidos com o estresse salino foram analisados por ANOVA seguida do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, tomando-se como base a germinação dentro e entre cada conjunto de tratamentos simultaneamente (Figura 14).

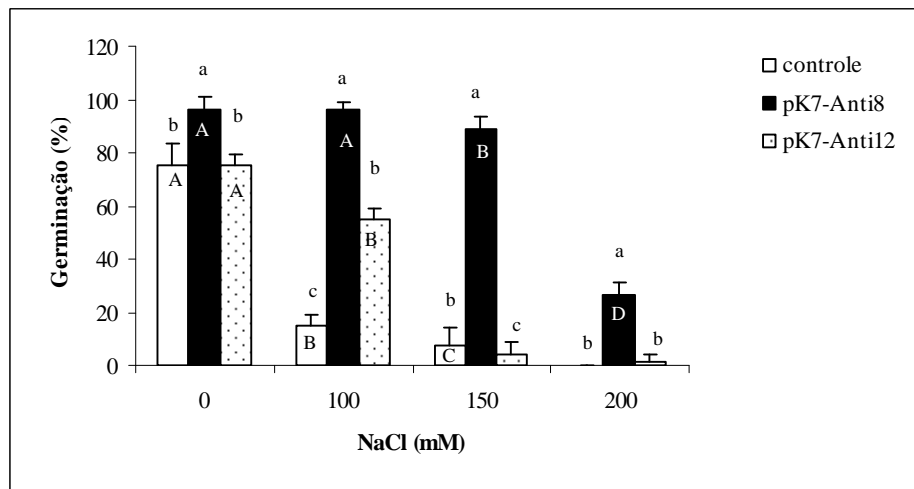


FIGURA 14 - Expressão do gene *TP-55* em *Arabidopsis* confere tolerância a estresse salino. A média de sementes germinadas de arábidoopsis entre os tratamentos testados (0 M NaCl, 0,1M NaCl, 0,15 M NaCl e 0,2 M NaCl) foi analisada por ANOVA seguido de Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), utilizando o programa ESTATÍSTICA AX 5.0, o qual relatou diferença significativa entre as médias dos tratamentos. Os dados apresentados constituem a média com o desvio padrão de cinco repetições de cada transformante independente. As comparações de médias entre os tratamentos são indicadas por letra maiúscula, enquanto que as comparações de médias dentro de cada tratamento são indicadas por letra minúscula. Letras diferentes indicam diferenças significativas.

A análise estatística revelou que tanto o transformante independente pK7-Anti8 quanto o transformante independente pK7-Anti12 apresentaram maior tolerância à germinação em condições de estresse salino quando comparados às plantas controles. Entretanto, a eficiência de germinação das sementes do transformante independente pK7-Anti8 foi muito superior em relação às sementes pK7-Anti12 e controle, mesmo em condições não estressadas. Também as plantas pK7-Anti8 apresentaram um desempenho de desenvolvimento muito superior (dado não mostrado), podendo essa diferença de crescimento ser explicada como efeito de posição de inserção do gene *TP-55* no genoma de arábidoopsis, não resultando em custo adicional para manter esse gene pela planta. De uma maneira geral, a superexpressão de aldeídos desidrogenases que participam do mecanismo de defesa da planta contra estresses abióticos compromete o

desempenho global de desenvolvimento da planta (TIMASHEFF, 1992; BOUROT et al., 2000).

As principais estratégias empregadas para minimizar os efeitos da toxidez salina são os bloqueios da entrada de Na⁺ ou o seqüestro desses íons no vacúolo intracelular, além da síntese de moléculas osmoprotetoras, como sacarose, prolina, betaína e trealose, as quais permitem o ajuste osmótico, além de estabilizar algumas macromoléculas e manter a integridade da membrana (GARCIA et al., 1997). De fato, plantas transgênicas de *Brassica juncea* transformadas com o gene *codA* de *Arthrobacter globiformis*, que codifica a enzima colina oxidase, envolvida na síntese do osmoprotetor glicina-betaína, apresentaram melhor performance que as plantas selvagens quando expostas a concentrações tóxicas de NaCl (PRASAD et al., 2000).

Uma vez que a expressão do gene *GmTP-55* que codifica uma aldeído desidrogenase em *N. tabacum* e *Arabidopsis thaliana* confere tolerância a estresse salino, é provável que a referida proteína TP-55 esteja envolvida em uma rota alternativa de ajustamento osmótico. Entretanto, uma outra consequência de diversos tipos de estresse, como o salino, é a produção de espécies ativas de oxigênio, que interagem com diversos componentes celulares. Diversos genes que codificam para aldeídos desidrogenases encontram-se envolvidos em rotas de detoxificação de compostos gerados pelo estresse oxidativo, cuja superexpressão tem sido empregada para a obtenção de plantas com melhor desempenho frente a diversos tipos de estresses abióticos (ROXAS et al., 1997). Assim sendo, os experimentos subseqüentes foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito da superexpressão de *TP-55* no desempenho de plantas submetidas a condições que promovem estresses oxidativos.

4.8. Plantas transgênicas de *N. tabacum* e *A. thaliana* expressando o gene *TP-55* apresentam tolerância a estresses oxidativo

4.8.1. Estresse produzido por H₂O₂

O estresse oxidativo é uma das maiores causas de dano resultado de estresses ambientais, ocorrendo primeiramente devido a acumulação excessiva de espécies oxigênicos reativos (ROS). A amplificação do dano ROS é estimulada pelo acúmulo de produtos de degradação tóxica, como aldeídos (SUNKAR et al., 2003). Como aldeídos

desidrogenases atuam oxidando aldeído propôs-se a realização de um experimento induzindo sementes transgênicas de *N. tabacum* e *A. thaliana* a estresse oxidativo por H_2O_2 , de modo a facilitar ao entendimento da função do gene *TP-55*.

Assim, sementes das plantas T0 TP-55 S2, T0 TP-55 S3 e de tabaco não transformado, bem como sementes das plantas de arábido Col-0, pK7-Anti8 e pK7-Anti12 foram plaqueadas em papel de filtro pré-hidratadas com soluções contendo concentrações diferentes de H_2O_2 . Após uma semana do início do plaqueamento, contou-se o número de sementes que germinaram em condições de estresse oxidativo para cada conjunto de plantas. A Figura 15 mostra o resultado fenotípico desse ensaio de germinação em plantas de tabaco.

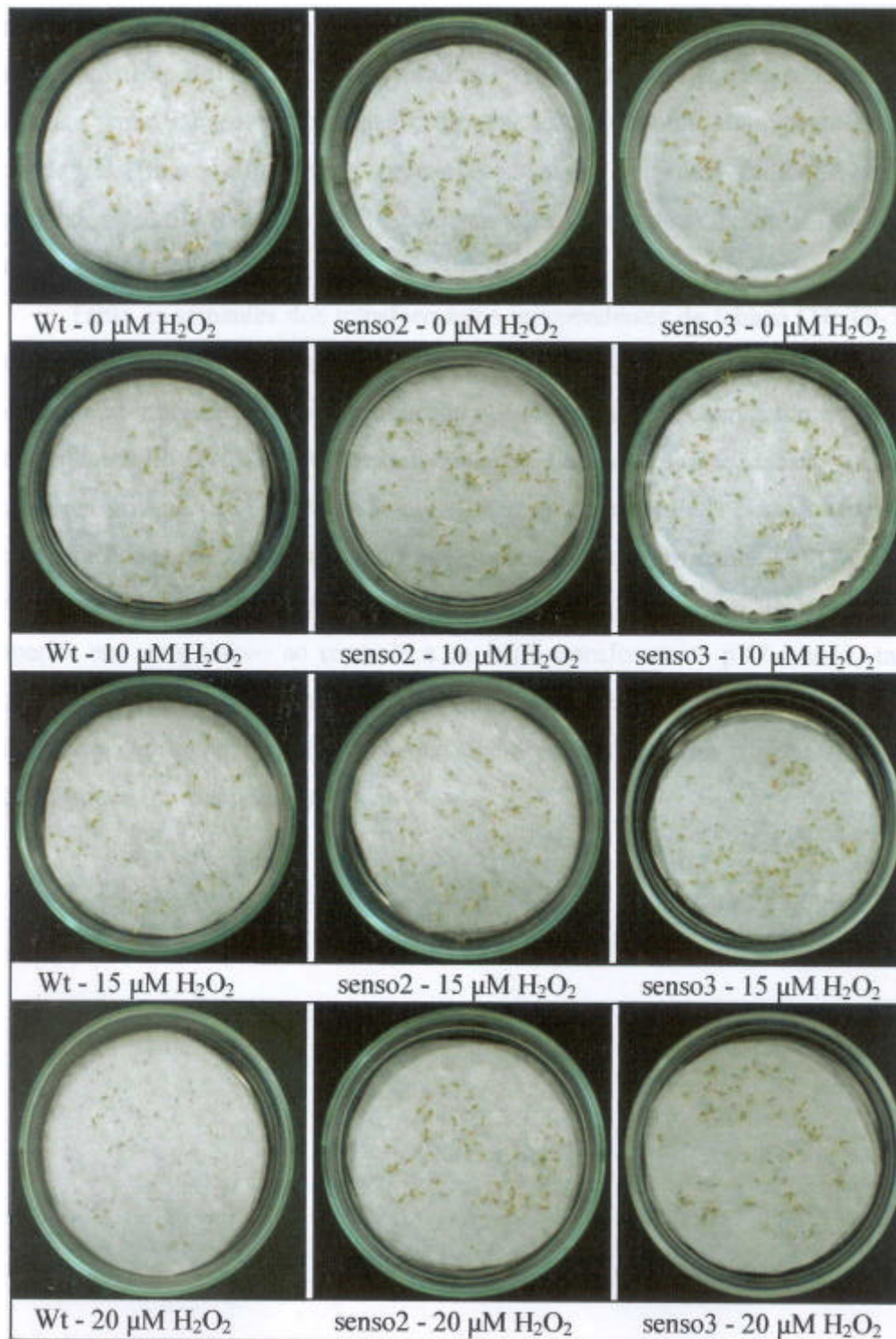
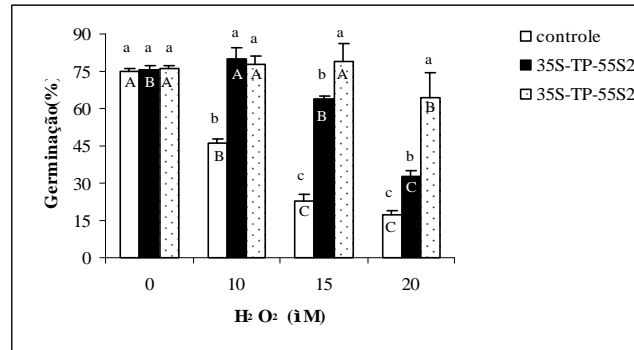


Figura 15 - Ensaio de germinação sob tratamento com H_2O_2 . Sementes dos transformantes independentes T0 TP-55 S2 (senso2), T0 TP-55 S3 (senso3) e da planta não transformada (Wt) de *N. tabacum* foram plaqueadas em meio contendo 0 μM ; 10 μM ; 15 μM e 20 μM de H_2O_2 , e germinadas por 15 dias.

As análises foram realizadas avaliando a média do número de sementes germinadas dentro e entre os tratamentos e o resultado obtido foi analisado por ANOVA seguida do teste de Tukey. Foram usadas 3 repetições para o ensaio de germinação realizado com tabaco, sendo que cada repetição continha 100 sementes; e para arabidopsis, foram utilizadas 4 repetições com 20 sementes cada. Os resultados estatísticos, tanto das plantas de tabaco quanto das plantas de arabidopsis transformadas são mostrados na Figura 16.

Tanto as sementes dos transformantes independentes de tabaco (T0 TP-55 S2 e T0 TP-55 S3) quanto os de arabidopsis (pK7-Anti8 e pK7-Anti12) apresentaram maior tolerância ao estresse oxidativo provocado por H₂O₂, quando comparado às respectivas plantas controles (Wt e Col-0, respectivamente). Enquanto que em tabaco, as sementes do transformante T0 TP-55 S3 apresentaram maior tolerância ao aumento da concentração de H₂O₂ no meio que as sementes do transformante T0 TP-55 S2; em arabidopsis, o transformante independente pK7-Anti8 exibiu um desempenho muito superior em comparação ao controle e ao outro transformante pK7-Anti12, tanto em condições normais quanto em condições estressadas. Este resultado reforça a idéia do baixo custo apresentado pela planta de arabidopsis em manter o gene *TP55* em um número maior no seu genoma.

[A]



[B]

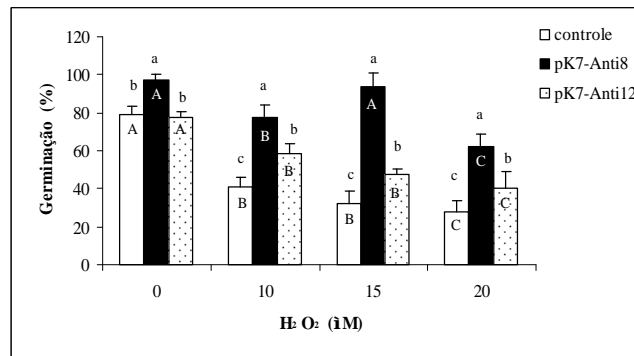


Figura 16 - Resultado do ensaio de germinação. A média de sementes germinadas de tabaco (A) e arabisopsis (B) entre os tratamentos testados (0 M H₂O₂, 10 M H₂O₂, 15 M H₂O₂ e 20 M H₂O₂) foram analisadas por ANOVA seguido de Teste de Tukey (α = 0,05), utilizando o programa ESTATISTICA AX 5.0. [A] Resultado apresentado para as sementes das plantas de tabaco T0 TP-55 S2, T0 TP-55 S3 e plantas controles (Wt). [B] Resultado apresentado para as plantas de arabisopsis pK7-Anti8, pK7-Anti12 e plantas controles (Col-0). Os dados apresentados constituem a média com o desvio padrão de três repetições de cada transformante independente para tabaco e quatro repetições para *Arabidopsis*. As comparações de médias entre os tratamentos são indicadas por letra maiúscula, enquanto que as comparações de médias dentro de cada tratamento são indicadas por letra minúscula. Letras diferentes indicam diferenças significativas.

4.8.2. Estresse produzido por paraquat

Metil velogênio (MV) ou paraquat pode ligar-se às membranas do tilacóide no cloroplasto e transferir elétrons para O_2 em reação em cadeia, causando formação contínua de radicais superóxido na presença de luz (ASADA, 1996). Portanto, esse herbicida causa estresse oxidativo tendo como consequência o dano da clorofila.

Assim, elaborou-se um experimento utilizando discos foliares de plantas de tabaco transformadas, T1 TP-55 S2 e T1 TP-55 S3, e da planta controle, os quais foram submetidos a concentrações variadas de paraquat por 18 h sob luz. Após esse período de incubação a injúria provocada pelo herbicida foi avaliada e mostrada na Figura 17.

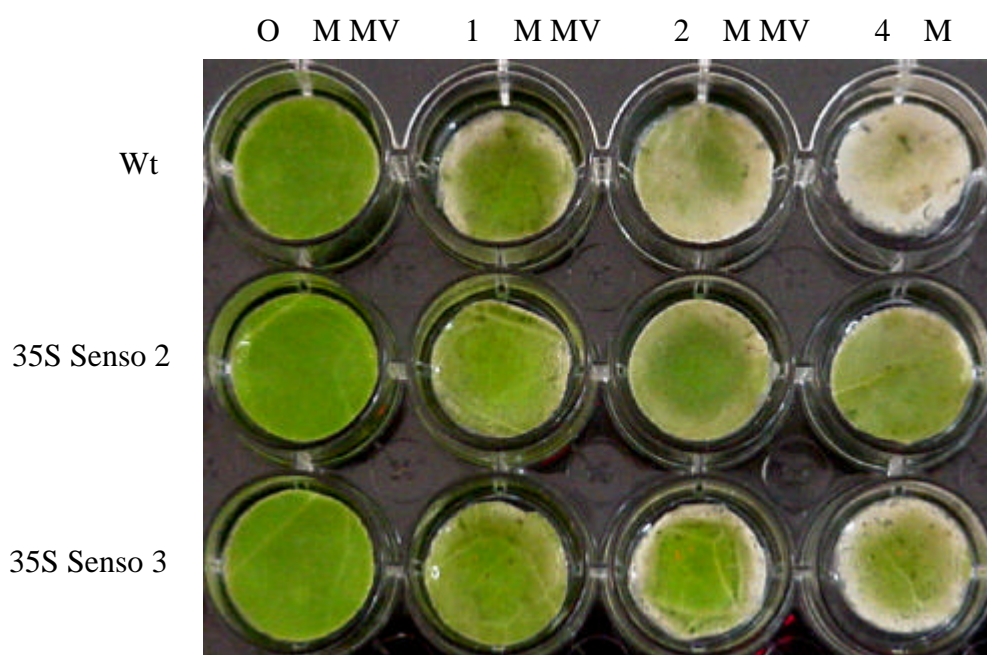


Figura 17 - Injúria visual provocada por paraquat. Discos foliares de 1,4 cm de diâmetro foram incubados em várias concentrações de paraquat (0, 1, 2 e 4 M) por 1 h no escuro seguido de 18 h sob luz. 35S senso 2 e 35S senso3 são discos foliares das plantas transgênicas T1 TP-55 S2 e T1 TP-55 S3, respectivamente, que foram transformadas com o cDNA da TP-55. Wt é planta controle.

A lesão provocada pelo paraquat refere-se ao grau de branqueamento no disco foliar das plantas de tabaco. Discos foliares de tabaco selvagem foram completamente branqueados após o período de incubação com paraquat, enquanto que os discos foliares de plantas de tabaco transgênicas visualmente armazenaram alguma clorofila, apresentando estímulo a senescência retardado. Os efeitos do paraquat, em termos de quantificação indireta da clorofila, foram determinados segundo a área do disco foliar necrosada (%), indicada pelo branqueamento utilizando o Programa Quant 1.0.1- R1 (VALE et al., 2003) e correlacionados com o nível de injúria (Tabela 2).

Tabela 2. Área foliar necrosada analisado pelo programa Quant 1.0.1-R1

Linhagens de plantas	Concentrações de paraquat			
	0 M MV	1 M MV	2 M MV	4 M MV
Wt	0%	37%	62,9%	98%
T1 TP-55 S2	0%	13%	22,1%	29,5%
T1 TP-55 S3	0%	14,4%	46,7%	58,8%

Os danos maiores causados à clorofila foi no disco foliar da planta controle, quando comparado às plantas transgênicas, apresentando quase perda total da clorofila com 4 M de MV, enquanto que as áreas necrosadas dos discos foliares das plantas T1 TP-55 S2 e T1 TP-55 S3 foram inferiores com os valores de 29,5% e 58,8% de clorofila, respectivamente, nesta concentração de MV. Entretanto, consistente com o grau de injúria observado, o transgênico T1 TP-55 S2 apresentou maior tolerância ao paraquat que o transgênico T1 TP-55 S3.

4.8.3. As linhagens transgênicas de tabaco são mais tolerantes a déficit hídrico.

Com a finalidade de avaliar o comportamento das plantas de tabaco transformadas T0 TP-55S2 e T0 TP-55S3 diante de déficit hídrico, sementes dessas plantas foram germinadas em meio MS0 (MURASHIGE E SKOOK, 1962) e um mês após germinação foram aclimatadas e transplantadas para casa-de-vegetação. Plantas controle, T1 TP-55S2 e T1 TP-55S3 foram submetidas a condições de seca até o aparecimento de murcha, como mostrado na Figura 18, tendo sido observado um

fenótipo de tolerância a desidratação das plantas transformadas. Enquanto que, após o período de seca, as folhas das plantas não transformadas murcharam totalmente, visualmente as folhas das linhagens transgênicas mantiveram um nível de turgidez muito superior.

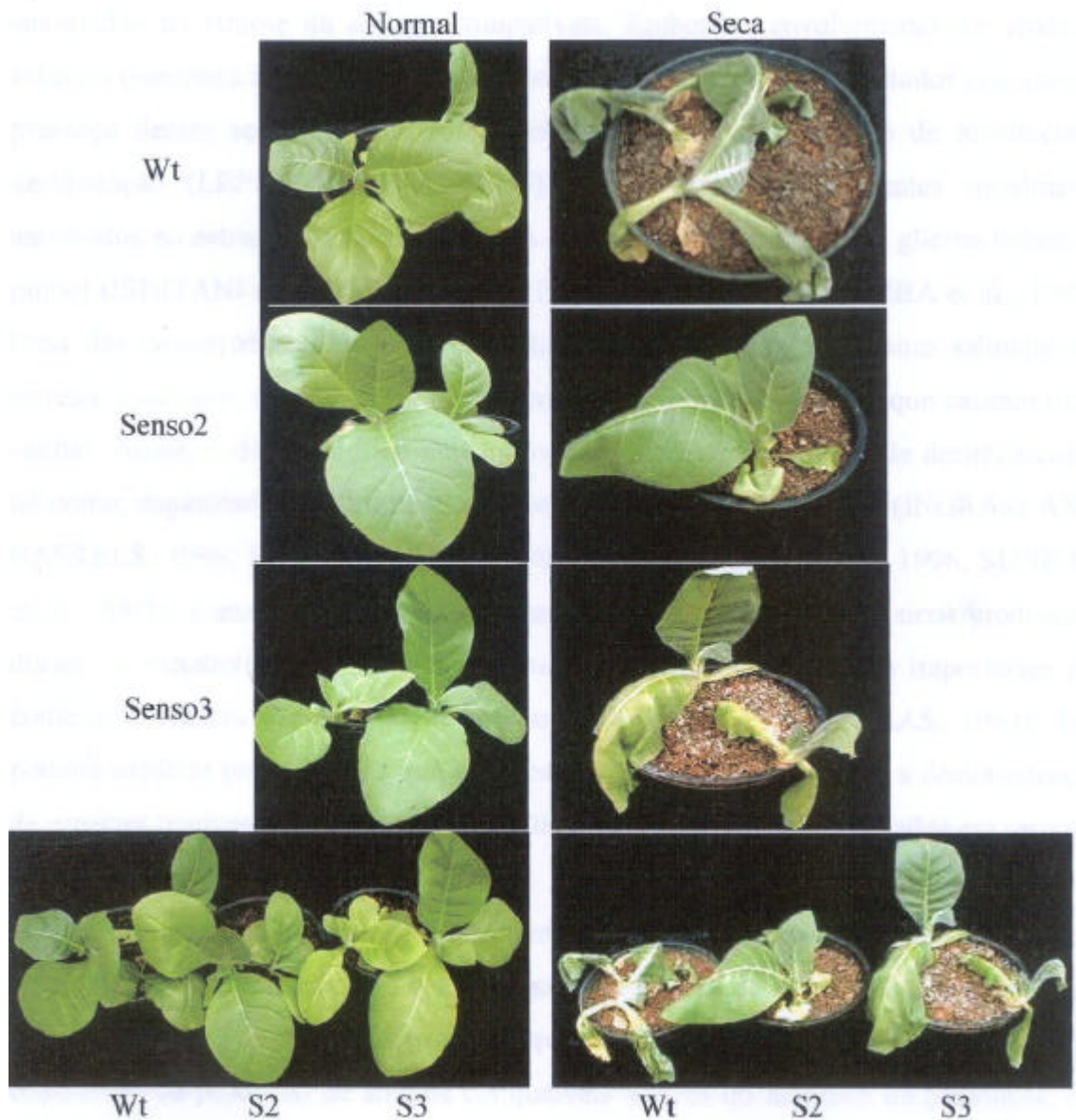


Figura 17 - Expressão ectópica de TP-55 confere tolerância a déficit hídrico em plantas transgênicas de tabaco. O estresse hídrico foi induzido em plantas não transformadas (WT), e linhagens transgênicas T1 TP-55 S2 (S2) e T1 TP-55 S3 (S3) pela cessação de irrigação até o aparecimento evidente de murcha nas folhas. À esquerda, são as contrapartidas das linhagens descritas nas quais foi mantido a irrigação contínua.

Baseado no fenótipo de tolerância à seca exibido pelas linhagens transgênicas, a expressão ectópica do gene *TP-55* pode ser associado com tolerância a déficit hídrico que levou a manutenção da turgidez foliar e conteúdo hídrico. Uma hipótese a ser considerada seria que a proteína TP-55 promoveu um maior nível de ajuste osmótico prevenindo a desidratação e mantendo turgidez. Consistente com esta hipótese a proteína TP-55 pertence à superfamília de aldeído desidrogenase que possui membros envolvidos na síntese de solutos compatíveis. Embora o envolvimento de açúcares solúveis tolerantes à desidratação em plantas tem sido sugerido em estudos nos quais a presença desses açúcares pode ser correlacionada com a aquisição de tolerância à desidratação (LEPRINCE et al., 1993), muitos outros componentes usualmente associados ao estresse salino são também ativados, tal como prolina, glicina betaína e pinitol (ISHITANI et al., 1995; MCCUE E HANSON, 1990, YOSHIBA et al., 1995). Uma das conseqüências da seca e muitos outros estresses, tais como salinidade e estresse oxidativo, é a produção de moléculas de oxigênio reativas que causam dano celular. Ainda, o déficit hídrico induz genes que codificam enzimas de desintoxicação tal como, superóxido dismutase, glutathione S-transferases, e ALDH3 (INGRAM AND BARTELS, 1996; SHINOZAKI AND YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1996; SUNKAR et al., 2003), e enzimas envolvidas na remoção de intermediários tóxicos produzidos durante o metabolismo de oxigênio, e que provavelmente são muito importantes em conferir tolerância a esse tipo de estresse (MITTLER E ZILINSKAS, 1994). Isso poderia explicar porque genes que codificam enzimas que promovem a desintoxicação de espécies reativas a oxigênio como ALDH3 em *arabidopsis* são regulados em resposta à seca (SUNKAR et al., 2003).

Até agora, diferentes estratégias tem sido empregadas para aumentar a tolerância a estresses ambientais como: a overexpressão de fatores de transcrição, os quais estão envolvidos na via de síntese de proteínas que conferem proteção a estresses ambientais; o aumento da produção de solutos compatíveis através do acúmulo de osmólitos; e a diminuição de efeitos deletérios provocados por estresse oxidativo pela superexpressão de enzimas envolvidas na detoxificação (SUNKAR et al., 2003).

Genes envolvidos na defesa antioxidante foram overexpressados e alguma tolerância às condições de estresses definidos foi registrada, embora não tenha sido suficiente para fornecer uma proteção estável (ROXAS et al., 1997). O aumento da tolerância observado em resposta aos altos níveis de osmólitos, tais como manitol ou glicina betaína, podem também ser por causa de propriedades antioxidantes (ROS)

desses osmólitos, tendo sido observado níveis diferentes de tolerância em resposta a diferentes estressores, refletindo a complexidade da rota e da via de estresse oxidativo (CHEN E MURATA, 2002; SHEN et al., 1997).

A observação do aumento da tolerância a uma ampla variedade de estresse foi obtido pela superexpressão da enzima *Ath-ALDH3* em *Arabidopsis*, senso comparável a superexpressão de *MsALR* de alfafa em tabaco. Esses estudos revelaram aumento de tolerância à desidratação, a estresse salino, ou metais pesados, com reduzidos danos quando expostos a estresse oxidativo como resultado da overexpressão de genes *ALDH3* (HIDEG et al., 2003; OBERSCHALL et al., 2000; SUNKAR et al., 2003). As análises de *Arabidopsis* (*Ath-ALDH3*) e plantas de tabaco (*MsALR* transgene) sugerem que o aumento da tolerância pode, em ambos os casos, ser resultado de baixos níveis de aldeídos, em resposta a uma diminuição da peroxidação de lipídeos, visto que freqüentemente, lipídeos e proteínas são marcados para dano oxidativo em tecidos sob condições de estresses ambientais (PRASSAD, 1996). A análise dessas plantas transgênicas sugere que, em ambos os casos, a tolerância ao estresse é obtida pela redução de aldeídos oxidativos, a moléculas não reativas (HIDEG et al., 2003; OBERSCHALL et al., 2000; SUNKAR et al., 2003).

O aumento da tolerância das linhagens transgênicas overexpressando *Gm-TP-55* foi relacionado com a diminuição do dano causado por diferentes estresses abióticos, tais como salinidade, seca e estresses oxidativos promovidos por tratamentos com H_2O_2 e paraquat. Esse aumento na tolerância foi verificado tanto na germinação das sementes quanto nas plantas adultas, indicando que a tolerância aos estresses manifestou-se por todo o período de crescimento vegetativo. Enquanto que algumas aldeído desidrogenases pertencentes à família ALDH10 e 12 exercem uma função direta em osmoregulação (INGRAM E BARTELS, 1996; VASILIOU et al., 2000; STROEHER, et al., 1995), outras aldeído desidrogenases da família ALDH1, 2 e 3 têm sido descritas como parte do sistema antioxidante de defesa (KIRCH et al., 2004; VASILIOU et al., 2000). Entre as ALDHs associadas com estresses, os membros da família ALDH7, também designadas de antiquitina, não foram ainda relacionados com nenhuma via bioquímica. Considerando que o denominador comum resultante dos estresses hídrico, salino e oxidativo seria a produção de ROS e aldeídos tóxicos derivados, provavelmente o gene *TP-55* esteja envolvido na detoxificação de aldeídos.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Por meio de análise de um banco de EST, gerado de uma biblioteca de sementes de soja, foi isolado, nesta investigação, o gene *TP-55* que codifica uma proteína de massa molecular estimada em 55.562 kDa. Análise comparativa da estrutura primária da proteína deduzida forneceu evidências de que o gene *TP-55* codifica um homólogo de antiquitina, pertencente à família ALDH7A1 da superfamília de aldeídos desidrogenases (ALDH). Além de possuir um domínio conservado de desidrogenases, análise filogenética baseada em seqüências de aminoácidos classificou a proteína TP-55 como membro da família ALDH7A1, possuindo 82% de identidade de seqüência com a proteína 26g de ervilha, e 60% de homologia com a proteína antiquitina, identificada principalmente no ouvido e rins de humanos. Consistente com o padrão de indução dos genes ALDH7A1 em resposta a estresses abióticos, foi demonstrado que condições de déficit hídrico e salinidade promovem um aumento no acúmulo da proteína TP-55 no caule e na raiz de plantas de soja.

Com a finalidade de avaliar a função do gene *TP-55 in vivo*, plantas transgênicas de tabaco e *Arabidopsis* foram obtidas. Em *Arabidopsis*, o cDNA *TP-55* fusionado a *GFP* foi usado para localizar a proteína quimérica TP-55-GFP a nível sub-celular por microscopia de fluorescência, demonstrando que a proteína localiza-se principalmente no núcleo e no citoplasma das células. Em tabaco, a transformação com o cDNA *TP-55* resultou em quatro transformantes independentes, cuja incorporação do DNA exógeno foi confirmada por PCR e a expressão do transgene por RT-PCR.

Após análise molecular, os estudos funcionais foram realizados com sementes das plantas controles comparados com os transformantes primários T0 TP-55 S2 e T0

TP-55 S3 de tabaco além de pK7-Anti8 e pK7-Anti12 de arabidopsis, as quais foram submetidas a diferentes concentrações de NaCl e H₂O₂, simulando estresse salino e oxidativo, respectivamente. A expressão do transgene *TP-55* conferiu às sementes transgênicas, tanto de arabidopsis quanto de tabaco, maior eficiência de germinação em meio contendo NaCl e H₂O₂.

Além disso, as plantas transgênicas de tabaco foram submetidas à seca e a estresse oxidativo provocado por paraquat. A expressão ectópica do gene *TP-55* em plantas de tabaco aumentou tanto a tolerância a desidratação, conforme observado pela manutenção da turgidez foliar em condições de seca, quanto a resistência a estresse oxidativo, pela diminuição de necroses foliares sob tratamento com paraquat. Coletivamente, estes resultados demonstraram que a expressão do gene *GmTP-55* tanto em tabaco como em arabidopsis conferiu às plantas transgênicas tolerância significativa contra os diversos estresses abióticos.

Tem sido demonstrado que algumas ALDHs atuam diretamente na osmoregulação, enquanto que outras têm sido descritas como parte do sistema antioxidante de defesa. Os membros da família ALDH7, também designadas de antiquitina, não foram ainda relacionados com nenhuma via bioquímica. Considerando que o denominador comum resultante dos estresses salino, hídrico e oxidativo seria a produção de ROS e aldeídos tóxicos derivados, os resultados, descritos nesta investigação, sugerem que provavelmente o gene *TP-55* esteja envolvido na detoxificação de aldeídos tóxicos.

ANEXO 1

	0 M sal	0,1 M sal	0,15 M sal	0,2 M sal
Controle	97	85	68	42
Controle	96	85	73	49
Controle	97	87	68	53
Controle	96	85	69	48
Controle	97	86	70	46
35S-TP55 S2	97	94	92	89
35S-TP55 S2	98	95	93	85
35S-TP55 S2	97	96	94	87
35S-TP55 S2	97	96	93	87
35S-TP55 S2	98	95	92	86

	0 M sal	0,1 M sal	0,15 M sal	0,2 M sal
Controle	97	85	70	47
Controle	95	87	67	48
Controle	98	86	72	46
Controle	96	85	69	48
Controle	98	86	68	47
35S-TP55 S3	99	96	92	57
35S-TP55 S3	98	95	91	56
35S-TP55 S3	97	96	93	55
35S-TP55 S3	99	93	91	54
35S-TP55 S3	98	95	90	54

Número de sementes germinadas das plantas controle, 35S-TP55 S2 (T1 TP-55 S2) e 35S-TP55 S3 (T1 TP-55 S3), em meio MSO sólido contendo 0 mM; 100 mM; 150 mM e 200mM de NaCl. As sementes consideradas germinadas possuíam raízes e folhas bem desenvolvidas.

ANEXO 2

	0 M sal	0,1 M sal	0,15 M sal	0,2 M sal
Controle	17	2	2	0
Controle	15	4	0	0
Controle	15	3	1	0
Controle	13	3	3	0
pK7-Anti8	18	20	19	6
pK7-Anti8	20	19	18	4
pK7-Anti8	20	19	17	5
pK7-Anti8	19	19	17	6
pK7-Anti12	16	11	0	0
pK7-Anti12	15	12	1	0
pK7-Anti12	15	10	2	1
pK7-Anti12	14	11	0	0

Número de sementes germinadas das plantas controle, pK7-Anti8 e pK7-Anti12, em meio MSO meia força sólido contendo 0 mM; 100 mM; 150 mM e 200mM de NaCl. As sementes consideradas germinadas possuíam raízes e folhas bem desenvolvidas.

ANEXO 3

	0 M H ₂ O ₂	10 M H ₂ O ₂	15 M H ₂ O ₂	20 M H ₂ O ₂
Controle	15	7	8	7
Controle	17	9	6	4
Controle	15	9	7	5
Controle	16	8	5	6
pK7-Anti8	19	17	20	14
pK7-Anti8	20	15	20	11
pK7-Anti8	20	16	18	13
pK7-Anti8	19	14	17	12
pK7-Anti12	16	12	10	7
pK7-Anti12	15	11	10	6
pK7-Anti12	15	13	9	9
pK7-Anti12	16	11	9	10

Número de sementes germinadas das plantas controle, pK7-Anti8 e pK7-Anti12, em papel de filtro mergulhado em soluções contendo 0 M; 10 M; 15 M e 20 M de H₂O₂. As sementes consideradas germinadas para efeito de cálculo possuíam raiz e folhas.

ANEXO 4

	0 M H ₂ O ₂	10 M H ₂ O ₂	15 M H ₂ O ₂	20 M H ₂ O ₂
Controle	74	45	26	19
Controle	76	46	22	17
Controle	75	48	21	15
35S-TP55 S2	77	75	63	33
35S-TP55 S2	76	84	64	31
35S-TP55 S2	74	81	65	35
35S-TP55 S3	77	78	82	63
35S-TP55 S3	75	81	71	56
35S-TP55 S3	76	74	84	75

Número de sementes germinadas das plantas controle, 35S-TP55 S2 (T1 TP-55 S2) e 35S-TP55 S3 (T1 TP-55 S3), em papel de filtro mergulhado em soluções contendo 0 M; 10 M; 15 M e 20 M de H₂O₂. As sementes consideradas germinadas para efeito de cálculo possuíam raiz e folhas.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALVIM, P. T. *Theobroma cacao*. A. H. Halevy (ed.) Handbook of flowering. CRC Press, Boca Raton, FL., 1985.

ADASA, K. Radical production and scavenging in the chloroplasts. In **Photosynthesis and environment** {Bakar, N. R., ed.} Dordrecht, the Netherlands Kluwer Academic, 123-150, 1996.

BADAWI, G. H., YAMAUCHI, Y., SHIMADA, E., SASAKI, R., KAWANO, N., TANAKA, K., KUBO, A. Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. **Plant Science**, 166: 919-928, 2004.

BARCLAY, K. D., MCKERSIE, B. D. Peroxidation reactions in plant membranes – effects of free fatty acids. **Lipids**, 29: 877-882, 1994.

BARTELS, D. Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance? **Trends Plant Sci**, 6: 284-286, 2001.

BERLATO, M. A. Carta de aptidão climática da soja no Rio Grande do Sul. **MIYSAKA**, Shiro & Medina, Júlio César. A Soja no Brasil. Ed 1. São Paulo, 1062 p., 1981.

BINZEL, M. L., HESS, F. D., BRESSAN, R. A., HASEGA, W. A. P. M. Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. **Plant Physiol**, 86: 607-614, 1988.

BOHNERT, H. J., NELSON, D. E., JENSEN, R. G. Adaptations to environmental stresses. **Plant Cell**, 7: 1099-1111, 1995.

BOHNERT, H. J., JENSEN, R. G. Strategies for engineering waterstress tolerance in plants. **Trends in Biotechnology**, 14: 89-97, 1996.

BOUROT, S., SIRE, O., TRAUTWETTER, A., TOUZÉ, T., WU, L. F., BLANCO, C., BERNARD, T. Glycine betaine-assisted protein folding in a *lysA* mutant of *Escherichia coli*. **Journal Biol Chem**, 275: 1050-1056, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254, 1976.

BRAY E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiol**, 103: 1035-1040, 1993.

BRAY E. A. Plant responses to water deficit. **Trends Plant Sci**, 2: 48-54, 1997.

BRAY. E. A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, 55 (407): 2331-2341, 2004.

CHEN, T. H., MURATA, N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. **Curr Opin. Plant Biol**. 5: 250-257, 2002.

CONTIM, L. A., WACLAWOVSKY, A. J., DELU-FILHO, N., PIROVANI, C. P., CLARINDO, W. R., LOUREIRO, M. E., CARVALHO, C. R., FONTES, E. P. The soybean sucrose binding protein gene family: genomic organization, gene copy number and tissue-specific expression of the SBP2 promoter. **Journal of Experimental Botany**, 54 (393): 2643-53 (11), 2003.

COSGROVE D. J. Water uptake by growing cells: an assessment of the controlling roles of wall relaxation, solute uptake and hydraulic conductance. **Journal Plant Science**, 154: 10-21, 1993.

DELÚ-FILHO, N., CASCARDO, J. C. M., FONTES, E. P. B. Clonagem molecular e isolamento de genes de plantas. In: Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. A. C. Torres, L. S. Caldas, J. A. Buso eds. **EMBRAPA Press**, Brasília-DF, 2: 653-677, 1999.

FAGERIA, N. K. Solos tropicais e aspectos fisiológicos das culturas. 1o ed. Brasília: Departamento de Publicações **EMBRAPA-CNPAP**, 381-392, 1989.

FONTES, E. P. B., SANTOS, A. A., LUZ, D. F., WACLAWOVSKY, A. J., CHORY, J. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. **Genes & Development**, 18: 2545-2556, 2004.

GARCIA, A. B., SURESH, I., ENGLER, J., GERATS. T., VAN MONTAGU, M., CAPLAN, A. B. Effect of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. **Plant Physiol**, 115: 59-169, 1997.

GUERRERO, F. D., JONES, J. T., MULLET J. E. Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. **Plant Molecular Biology**, 15: 11-26, 1990.

GUO, C., OOSTERHUIS, D. M. Effect of water-deficit stress and genotypes on pinitol occurrence in soybean plants. **Environ. Exp. Bot. Environ. Exp. Bot**, 37: 2-5, 1997.

HASEGAWA, P. M., BRESSAN, R. A., ZHU, J. K., BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, 51: 463-499, 2000.

HIDEG, E., NAGY, T., OBERSCHALL, A., DUDITS, D., VASS, L. Detoxificação funcional of aldose/aldehyde reductase during drought and ultraviolet-B {280-320 nm} stress. **Plant Cell Environ**, 26: 513-522, 2003.

HILAL, M., CASTAGNARO, A. P., MORENO, H., MASSA, E. M. Specific location of the respiratory alternative oxidase in meristematic and xylematic tissues from developing soybean roots and hypocotyls. **Pant Physiology**, 155: 1499-1503, 1997.

HUANG, J., HIRJ, I. R., ADAM, L., ROZWADOWSKI, L., HAMMERLINDL, J. K., KELLER, W. A., SELVARA, J. Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. **Plant Physiology**, 122: 747-756, 2000.

INGRAN, J., BARTELS, D. The molecular basis of dehydration in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Pant Molecular Biology**, 47: 377-403, 1996.

INGROUILLE, M. Diversity and evolution of land plants. **Chapman & Hall**, London, UK. 340 pp., 1992.

ISHITANI, M., NAKAMURA, T., HAN, S. Y., TAKABE, T. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. **Plant Mol. Biol.** 27: 307-15, 1995.

KATERJI, N., VAN HOORN, J. W., HAMDY, A., MASTRORILLI, M. Salinity effect on crop development and yield, analysis of salt tolerance according to several classification methods. **Agric. Water Manage.** 62, 37-66, 2003.

KEEGSTRA, K., CLINE, K. Protein import and routing systems of chloroplasts. **The Plant Cell**, 11 (4): 557-570, 1999.

KIRCH, H-H., NAIR, A., BARTELS, D. Novel ABA-dehydration-inducible aldehyde dehydrogenase genes isolated from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* and *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, 28: 555-567, 2001.

KIRCH, H-H., BARTELS, D., WEI, Y., SCHNABLE, P. S., WOOD, A. J. The ALDH gene superfamily of *Arabidopsis*. **TRENDS in Plant Science**, 9 (8): 371-377, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.

LEE, P., KUHL, W., GELBART, T., KAMIMURA, T., WEST, C., BEUTLER, E. Homology between a human protein and a protein of the garden pea. **Genomics**, 21: 371-378, 1994.

LEPRINCE, O., HENDRY, G. A. F., MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Sci. Res.** 3: 231-46, 1993.

LUDLOW, M. Contribution of osmotic adjustment to the maintenance of photosynthesis during water stress. In **J. Biggens (ed.) Progress in Photosynthesis Research**, Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands, 161-168, 1987.

MCCUE, K. F., HANSON, A. D. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. **Trends Biotech.** 8: 358-62, 1990.

MITTLER, R., ZILINSKI, A. S. B. A. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. **Plant Journal**, 5 (3): 397-405, 1994.

MIYASAKA, S., MEDINA, J. C. A soja no Brasil. 1^o ed. São Paulo: **ITAL**, 1-174, 1981.

MUNNS, R. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. **Plant Cell Environ**, 16: 15-24, 1993.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.

NAKAZONO, M. TSUJI, H., LI, Y., SAISHO, D., ARIMURA, S., TSUTSUMI, N., HIRAI, A. Expression of a Gene Encoding Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase in Rice Increases under Submerged Conditions. **Plant Physiology**, 124: 587-598, 2000.

NEPOMUCENO, A. L., FARIAS, J. R. B., NEUMAIER, N. Efeitos da disponibilidade hídrica no solo sobre a cultura da soja. **EMBRAPA-CNPSO**, Ata - Documentos 72. Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 15. Londrina-PR, 42-43, 1994.

NEPOMUCENO, A. L., OOSTERHUIS, D. M., STEWART, J. M. Physiological responses of cotton leaves and roots to water deficit induced by polyethylene glycol. **Environmental and Experimental Botany**, 40: 29-41, 1998.

OBERSCHALL, A., DEAK, M., TÖRÖK, K., SAA, L., VASS, L., KOVACS, L., FEHER, A., DUDITS, D., HORVATH, G. V. A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. **Plant Journal**, 24: 437-446, 2000.

OOSTERHUIS, D., WULLSCHLEGER, S. D. Drought tolerance and osmotic adjustment of various crops in response to water stress. **Arkansas Farm Research**, Jan-Feb, p. 12, 1988.

PEROZICH, J., NICHOLAS, H. B. J. R., WANG, B-C., LINDAHL, R., HEMPEL, J. Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. **Protein Sci**, 8: 137-146, 1999 a.

PEROZICH, J., NICHOLAS, H. B. J. R., LINDAHL, R., HEMPEL, J. The big book of aldehyde dehydrogenase sequences: an overview of the extended family. In **Advances in Experimental Medicine and Biology**, (Weiner, H. et al., eds.) 463: 1-7, Kluwer, 1999 b.

PRASSAD, T. K. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. **Plant Journal**, 10: 1017-1026, 1996.

PRASAD, K. V. S. K., SHARMILA, P., KUMAR, P. A., SARADHI, P. P. Transformation of *Brassica juncea* (L.) Czern with bacterial *codA* gene enhances its tolerance to salt stress. **Mol. Breeding**, 6: 489-499, 2000.

RASBAND, W. Image SXM 1.61. A public domain software for image analysis, written at the US National Institute of Health, extensions by Steve Barret and available from the Internet by anonymous ftp from [zippy.nimh.nih.gov](ftp://zippy.nimh.nih.gov), 1997.

REIS, V. M., CRUZ, G. B., FERREIRA, A., FERNANDES, M. F., FERREIRA, A. C., REIS, F. B., RIBEIRO, J. R. A., SALLES, J. F., WEBER, O. B. Produção e caracterização de soros policlonais para a detecção de bactérias diazotróficas. Seropédica: **EMBRAPA-CNPAB**, 11p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 30), 1997.

RHODES, D., HANSON, A. D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, 44: 357-384, 1993.

ROXAS, V. P., SMITH, R. K., ALLEN, E. R. J. R., ALLEN, R. D. Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. **Nature Biotechnol.** 15: 988-991, 1997.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SEKI, M., NARUSAKA, M., ISHIDA, J., NANJO, T., FUJITA, M., OONO, Y., KAMIYA, A., NAKAJIMA, M., ENJU, A., SAKURAI, T., SATOU, M., AKIYAMA, K., TAJI, T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., CARNINCI, P., KAWAI, J., HAYASHIZAKI, Y., SHINOZAKI, K. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **Plant Journal**, 31: 279-292, 2002.

SHARP, R. E., POROYKO, V., HEJLEK, L. G., SPOLLEN, W. G., SPRINGER, G. K., BOHNERT, H. J., NGUYEN, H. T. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. **Journal of Experimental Botany**, 55 (407): 2343-2351, 2004.

SHEN, B., JENSEN, R. G., BOHNERT, H. J. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting manitol biosynthesis to chloroplasts. **Plant Physiol**, 113: 1177-1183, 1997.

SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Molecular responses to drought and cold stress. **Curr. Opin. Biotechnol**, 7: 161-167, 1996.

SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, 115: 327-334, 1997.

SKVORAK, A. B., ROBERTSON, N. G., YIN, Y., WEREMOWICZ, S., HER, H., BIEBER, F. R., BEISEL, K. W., LYNCH, E. D., BEIER, D. R., MORTON, C. C. An ancient conserved gene expressed in the human inner ear: identification, expression analysis, and chromosomal mapping of human and mouse antiquitin (ATQ1). **Genomics**, 46: 191-199, 1997.

SOPHOS, N. A., PAPPAS A., ZIEGLER T., VASILIOU, V. ALDEHYDE dehydrogenase gene superfamily: the 2000 update. **Chem. Biol. Interact**, 130-132: 323-337, 2001.

STROEHER, V. L., BOOTHE, J. G., GOOD, A. G. Molecular cloning and expression of a turgor-responsive gene in *Brassica napus*. **Plant Mol. Biol**, 27 (3): 541-551, 1995.

SUNKAR, R., BARTELS, D., KIRCH, H. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. **The Plant Journal**, 35: 452-464, 2003.

TAIZ, L., ZEIGER, E. Biochem and Mol. Bio Inc, chapters 13 & 15. 3rd edn. Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts. **Plant Physiology**, (792 pp.), 1998.

TIMASHEFF, S. N. A physiochemical basis for selection of osmolytes by nature. In **GN Somero**, CB Osmond, CL Bolis, eds, *Water and Life*. Springer-Verlag, Berlin, 70-84, 1992.

VALE, F.X. R., FERNANDES FILHO, E. I., LIBERATO, J. R. QUANT-A software for plant disease severity assesment. In: **8th International Congress of Plant Pathology**, Christchurch, New Zealand, pp. 105, 2003.

VASILIOU, V., BAIROCH, A., TIPTON, K. F., NEBERT, D. W. Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. **Pharmacogenetics**, 9: 421-434, 1999.

VASILIOU, V., PAPPA, A., PETERSEN D. R. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. **Chem. Biol. Interact**, 129, 1-19, 2000.

VERSLUES P. E., SHARP, R. E. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. II. Metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone. **Plant Physiology**, 119, 1349-1360, 1999.

VOETBERG, G. S., SHARP, R. E. Growth of the maize primary root at low water potentials. III. Role of increased proline deposition in osmotic adjustment. **Plant Physiology**, 96: 1125-1130, 1991.

WOOD, A. J., KRAYESKY, S. The role of aldehyde dehydrogenases (ALDHs) in plant stress tolerance. In **Biochemical & Molecular Responses of Plants to the Environment**, Research Signpost. pp. 1-14, 2002.

YOKOI, S., RAY, A. B., HASEGAWA, P. M. Salt Stress Tolerance of Plants. **JIRCAS Working Report**, 25-33, 2002.

YOSHIBA, Y., KIYOSUE, T., KATAGIRI, T., UEDA, H., MIZOGUCHI, T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., WADA, K., HARADA, Y., SHINOZAKI, K. Correlation between the induction of a gene for d1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. **Plant Journal**, 7 (5): 751-60, 1995.

YOSHIDA, A., RZHETSKY, A., HSU, L. C., CHANG, C. Human aldehyde dehydrogenase gene family. **Eur. Journal Biochem**, 251: 549-557, 1998.

ZHU, J-K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Sci**, 6: 66-71, 2001.

ZIMMERMANN, U. Physics of turgor and osmoregulation. **Annu Rev Plant Physiol**, 29: 121-148, 1978.