

DANIELA PEREIRA PINHEIRO

**EFEITO DA REDUÇÃO DO TRANSPORTE DA
SACAROSE NAS CÉLULAS-GUARDA NA RESPOSTA
AO ESTRESSE OSMÓTICO E EXPRESSÃO PROTÉICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

DANIELA PEREIRA PINHEIRO

**EFEITO DA REDUÇÃO DO TRANSPORTE DA SACAROSE NAS
CÉLULAS-GUARDA NA RESPOSTA AO ESTRESSE OSMÓTICO E
EXPRESSÃO PROTÉICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de junho de 2011

Prof. Adriano Nunes Nesi

Prof. Humberto Josué de Oliveira Ramos

Prof. Thomas Christopher Rhys Williams
(Co-orientador)

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro
(Orientador)

Aos meus queridos pais Dezinho e Cida,

à minha irmã Danúbia,

DEDICO E OFEREÇO

*“Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível e, de repente,
você estará fazendo o impossível.”*

São Francisco de Assis

“Tudo posso Naquele que me fortalece.”

(Filipenses 4, 13)

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

A FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade, disponibilidade de espaço físico e convívio social.

Ao Núcleo de Análises de Biomoléculas, NuBioMol, pela realização de toda a parte de proteoma. E aos colegas Edvaldo e Mateus, sempre dispostos a ajudar.

Ao Prof. Marcelo E. Loureiro, por todo o aprendizado e orientação!

Ao Prof. Humberto Josué de Oliveira Ramos e ao Prof. Adriano Nunes Nesi pela aceitação em participar da banca examinadora.

A todos os professores, colegas e grandes amigos da Fisiologia Vegetal.

À Mercês, pelo o zelo e dedicação!

Aos meus queridos pais, Cida e Dezinho, e à minha irmã Danúbia, por todo o apoio, torcida e amor!

A minha Grande família, primos, tios, de perto e de longe, por toda a alegria de viver e incentivo.

A todos os meus amigos, que sempre me motivaram a seguir em frente, me ensinando que é preciso “gastar tempo” com aqueles que amamos e me mostrando que... “A vida é bela”!!

E não posso me esquecer, de forma alguma, dos fiéis companheiros e amigos do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas! Sem deixar de citar a Sabrina, a Esther, a Alice, a Vivi, o Eduardo, o Camilo e a Rose, por toda a amizade, disponibilidade, ajuda e incentivo. Em especial a esta última pessoa, que além de me ensinar a gostar de Proteoma, se tornou uma amiga para todas as horas.

E também a esses meninos mais que especiais, Werner, Danilo e Tom, presentes de Deus, que estiveram sempre comigo, me ensinando, apoiando, “sofrendo” junto e também dando muitas risadas!!

E a todos aqueles que contribuíram para minha formação profissional e pessoal ao longo desses anos em Viçosa.

E por fim, agradeço ao Bom Deus!! Meu Grande Amigo e companheiro! Pela minha Vida e por todo o infinito e incomparável Amor!!!

BIOGRAFIA

DANIELA PEREIRA PINHEIRO, filha de José Cupertino Pinheiro e Maria Aparecida Pereira Pinheiro, nasceu em Viçosa, MG, no dia 12 de julho de 1985. Concluiu o ensino médio em dezembro de 2003, no Colégio de Aplicação – COLUNI, UFV, em Viçosa, MG. Em março de 2004 iniciou o curso de Bioquímica na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, graduando-se em janeiro de 2009. Ingressou, em março de 2009, no mestrado no Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, obtendo o título de *Magister Scientiae* em 24 de junho de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4
CAPÍTULO I	
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1. Material Vegetal e Condições Experimentais.....	12
2.2. Condições experimentais em hidroponia.....	13
2.3. Área Foliar total.....	13
2.4. Caracterização de parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	13
2.5. Determinação da peroxidação lipídica.....	14
2.6. Análise termográfica de infravermelho.....	15
2.7. Delineamento experimental e análise estatística.....	15
3 RESULTADOS.....	15
3.1. Análise do crescimento.....	15
3.2. Análise das trocas gasosas.....	16
3.3. Parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i>	18
3.4. Peroxidação de lipídios.....	21
3.5. Termografia de infravermelho.....	21
4 DISCUSSÃO.....	22
4.1. Efeito do estresse osmótico induzido por PEG no crescimento e nas trocas gasosas.....	22
4.2. Efeito do estresse osmótico induzido por PEG nos parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i>	24
4.3. Efeito do estresse osmótico induzido por PEG na peroxidação de lipídios e na termometria de infravermelho.....	25
5 CONCLUSÃO.....	27
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

CAPÍTULO II

RESUMO.....	32
ABSTRACT.....	34
1 INTRODUÇÃO.....	36
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1. Material Vegetal e Condições Experimentais.....	37
2.2. Preparação de fragmentos epidérmicos enriquecidos com células-guarda.	38
2.3. Extração de Proteínas totais de folha e células-guarda de tabaco.....	38
2.4. Separação das proteínas em géis bidimensionais.....	39
2.5. Visualização das proteínas em géis bidimensionais, análise de imagem, e quantificação.....	40
2.6. Digestão Triptica.....	40
2.7. Análise por espectrometria de massa e identificação de proteínas.....	41
3 RESULTADOS.....	41
3.1. Extração de Proteínas.....	41
3.2. Análise do proteoma diferencial de folhas em plantas de tabaco selvagem e transgênica.....	43
3.3. Análise do proteoma diferencial de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda em plantas de tabaco selvagem e transgênica.	44
3.4. Análise de algumas proteínas abundantes do proteoma de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda.....	49
4 DISCUSSÃO.....	52
4.1. Extração de Proteínas.....	52
4.2. Proteoma diferencial de folhas em plantas de tabaco selvagem e transgênica.....	52
4.3. Proteoma diferencial de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda em plantas de tabaco selvagem e transgênica.....	53
4.4. Proteínas abundantes do proteoma de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda.....	55
5 CONCLUSÃO.....	56
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

RESUMO

PINHEIRO, Daniela Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2011. **Efeito da redução do transporte da sacarose nas células-guarda na resposta ao estresse osmótico e expressão protéica.** Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-Orientadores: Werner Camargos Antunes e Thomas Christopher Rhys Williams.

Estudos indicam que a sacarose tem um importante papel osmo-regulatório nas células-guarda (CG), sendo hipotetizado que sua origem principal seria a importação deste soluto das células do mesófilo foliar. Plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas com vetor contendo construção antisense do gene do transportador de sacarose (P62) sob controle do promotor *KST1*, específico de CG, apresentam menor condutância estomática e um aumento na eficiência do uso da água comparado a plantas selvagens (WT), resultando em plantas com menor consumo de água. Estresse osmótico induzido pela aplicação de polietileno glicol (PEG) à solução de cultivo resultou em uma reduzida área foliar total em todas as plantas, sendo esta redução menor nas plantas transgênicas. A redução da fotossíntese (A) sob estresse osmótico, observada somente nas plantas não-transformadas, foi associada a uma menor condutância estomática (g_s) e redução da razão C_i/C_a . Entretanto, a taxa fotossintética de plantas WT a 2,0% de PEG, sob altas concentrações de CO_2 , foi reduzida em 31%, indicando que há uma limitação bioquímica do processo fotossintético produzida por este nível de estresse osmótico. Porém, esse fato não é explicado por danos oxidativos visto que não houve variação na taxa de peroxidação de lipídios. Não foram observadas diferenças nos parâmetros relacionados à fluorescência F_v/F_m , $Y(II)$, ETR e q_p , para as plantas avaliadas, evidenciando que tanto plantas de genótipo selvagem quanto transgênica não apresentaram limitações no uso da energia de excitação para reações fotoquímicas. No entanto, plantas WT submetidas ao estresse osmótico (1,5% e 2,0% de PEG) apresentaram valores maiores de q_N , indicando uma maior dissipação térmica. Comparando o proteoma de células-guarda, plantas P62 apresentaram aumento na expressão de proteínas-chave relacionadas à fixação fotossintética de carbono tais como a sedoheptulose-1,7-bifosfato fosfatase e a ativase da rubisco, sugerindo uma maior assimilação de CO_2 e atividade do ciclo de Calvin, o que poderia sugerir um mecanismo homeostático de manutenção dos teores de sacarose nestas células. Presença de fotossíntese nas

células-guarda pode também ser indiretamente inferida, visto que se identificou outras proteínas fotossintéticas, como a proteína PsaD do fotossistema I e algumas subunidades da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco). A análise proteômica diferencial de folhas revelou que não há diferença significativa entre plantas WT e P62, consistente com o uso de um promotor específico para células-guarda para dirigir a expressão da construção antisense. Como conclusão, este trabalho sugere que reduções no transporte de sacarose podem contribuir para maior tolerância ao estresse osmótico e maior eficiência do uso da água.

ABSTRACT

PINHEIRO, Daniela Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2011. **Effects of the reduction in sucrose transport in guard-cells on the responses to osmotic stress and on protein expression.** Adviser: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-Advisers: Werner Camargos Antunes and Thomas Christopher Rhys Williams.

Studies indicate that sucrose has an important role in guard cell osmoregulation (GC) and the current hypothesis is that this sucrose is transported from mesophyll cells. Plants of *Nicotiana tabacum* transformed with an antisense gene construct for sucrose transporter (P62) driven by KST1, a GC specific promoter, exhibit lower stomatal conductance and higher water use efficiency compared to wild type plants (WT), resulting in plants with lower water consumption. Osmotic stress produced by cultivation under hydroponic solution in the presence of PEG resulted in a reduction in total leaf area in all plants, being this reduction lower in P62 plants. A reduction in photosynthesis (A) under these conditions of osmotic stress, which was observed only in non-transformed plants, was associated with lower stomatal conductance (g_s) and a reduction in C_i/C_a . The photosynthetic rate during treatment with 2.0% PEG and under high CO_2 concentrations was reduced by 31%, indicating that there is a biochemical limitation of photosynthesis produced by this level of osmotic stress. However, this observation cannot be explained by increased oxidative damage, as there was no change in the level of lipid peroxidation. Additionally there were no differences in F_v/F_m , $Y(II)$, ETR and q_P , for the plants assessed, showing that both wild type and transgenic plants did not exhibit limitations in their use of excitation energy for photochemical reactions. However, WT plants subjected to osmotic stress (1.5% and 2.0% PEG) showed higher values of q_N , indicating a higher thermal dissipation. Comparison of the guard cell proteome, P62 guard cells showed increased expression of key proteins related to photosynthetic carbon fixation such as sedoheptulose-1,7-bisphosphatase and Rubisco activase, suggesting a greater rate of CO_2 assimilation and Calvin cycle activity, what could suggest a homeostatic mechanism to maintain the sucrose level in these cells. Presence of photosynthesis in guard cells could be also supported by the identification of PsaD subunit of photosystem I and some subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco). Data from the differential proteomic

analysis of leaves revealed no significant differences between WT and P62 plants, consistent with the use of a guard cell specific promoter to drive expression of the antisense construct. As conclusion, this work suggests that reductions in sucrose transport could contribute for higher tolerance to osmotic stress and water use efficiency.

INTRODUÇÃO GERAL

Estômatos são estruturas epidérmicas constituídas de duas células-guarda que envolve um poro, cuja abertura é regulada através de mudanças no turgor destas células. Esta regulação permite o controle das taxas de assimilação de CO₂ e de perda de água durante a transpiração, influenciando assim, a fotossíntese e o estado hídrico da planta (Fan *et al.*, 2004). As células-guarda são altamente especializadas integrando sinais relativos às condições hídricas, estímulos hormonais, luz, umidade do ar, entre outras condições ambientais, de forma a otimizar a abertura estomática para o crescimento e o fechamento para tolerar determinados estresses ambientais, como a seca (Schroeder *et al.*, 2001).

As células-guarda possuem um espessamento diferencial de suas paredes e uma disposição assimétrica das fibrilas de celulose. Desse modo, o aumento ou redução no volume dessas células promovem abertura ou fechamento do poro estomático, respectivamente (Fig. 1). Tais alterações são provocadas por variações no potencial hídrico destas células, devido a diferenças nas concentrações de íons e outros solutos no seu interior (Fan *et al.*, 2004).

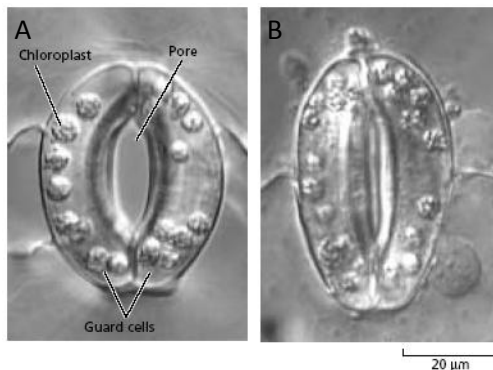
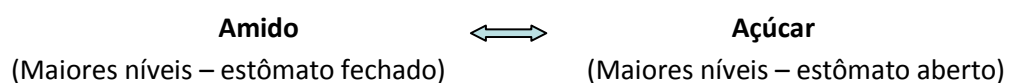


Figura 1: Micrografia de um estômato no estado aberto (A) evidenciando as células-guarda túrgidas e conseqüente abertura estomática; e em (B) o estômato fechado (Figura adaptada de Taiz e Zeiger, 2004).

A variação na concentração de carboidratos solúveis foi inicialmente proposta como sendo a principal responsável pelo mecanismo dos movimentos estomáticos (Hite *et al.*, 1993). A então chamada Teoria Clássica foi exemplificada por Sayre (1926):



A descoberta, na década de 1960, das alterações da concentração de potássio nas células-guarda conduziu à outra teoria da osmorregulação dessas células pelo potássio e seus contra-íons malato e cloreto, e a hipótese do açúcar-amido não foi mais considerada importante (Outlaw, 1983).

Sinais que promovem a abertura estomática, dentre eles a luz azul, ativam a extrusão de H^+ a partir da ativação de H^+ -ATPases da membrana plasmática das células-guarda promovendo a acidificação do apoplasto (Fan *et al.*, 2004). O componente elétrico do gradiente de prótons fornece a força motriz para a absorção de íons potássio pelos canais de K^+ regulados pela voltagem (Schroeder *et al.*, 2001). O influxo de K^+ é balanceado pelo influxo de seus contra-íons Cl^- (proveniente do apoplasto) e malato⁻² (provavelmente derivado da degradação do amido). Da mesma forma, o efluxo de K^+ ocorre por meio dos canais iônicos de potássio ativados pela despolarização da membrana.

Um interesse renovado no metabolismo das células-guarda tem advindo de estudos que indicam que a sacarose tem um importante papel osmo-regulatório em células-guarda de folhas intactas (Talbot e Zeiger, 1996; Lu *et al.*, 1997; Talbot e Zeiger, 1998; Outlaw Jr, 2003). Estes estudos mostram que a concentração de potássio na célula-guarda aumenta em paralelo com a abertura estomática no início da manhã, diminuindo ao final da tarde sob condições nas quais a abertura continua a aumentar (Fig. 2). Entretanto, o nível de sacarose aumenta lentamente no início da manhã, mas acumula-se rapidamente no final da tarde, onde, então, passaria a ser o soluto osmoticamente ativo dominante. O fechamento estomático, no final do dia, é acompanhado por um decréscimo no conteúdo de sacarose nas células-guarda (Talbot e Zeiger, 1998).

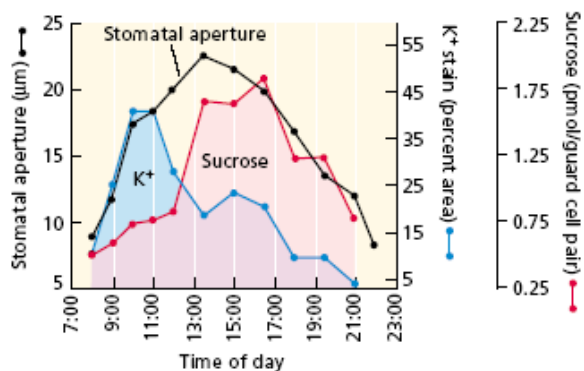


Figura 2: Curso diurno das mudanças na abertura estomática e nos conteúdos de potássio e sacarose, das células-guarda de folhas intactas de *Vicia faba*. Adaptado de Talbot e Zeiger (1998).

Entretanto, a importância relativa dos solutos envolvidos na osmorregulação da célula-guarda tem sido tema de muitos debates, de maneira que ainda não existe um consenso no que se refere à importância da sacarose no mecanismo de osmorregulação das células estomáticas (Talbot e Zeiger, 1996; Outlaw e Zhang, 2001; Lawson, 2009). De forma complementar ao possível papel da sacarose na osmorregulação estomática, verificou-se que as enzimas de síntese e degradação da sacarose, sacarose fosfato sintase (SPS) e sacarose sintase (SuSy), respectivamente, têm altos níveis de atividade nas células-guarda, quando comparadas com outros tipos de células encontradas em folhas (Hite *et al.*, 1993). Estes resultados fortemente sugerem que o metabolismo da sacarose em células-guarda pode contribuir significativamente para a regulação da abertura estomática.

Os cloroplastos de células-guarda são frequentemente menores e em menor número que aqueles encontrados em células mesofílicas (Lawson, 2009), e a atividade da enzima-chave na fixação do carbono no Ciclo de Calvin, ribulose bifosfatocarboxilase/oxigenase (Rubisco), nessas células é baixa comparada às células mesofílicas (Wang e Song, 2008).

Nesse sentido, alguns estudos têm sugerido que as alterações nos teores de sacarose nas células-guarda poderiam ser originadas de alterações no transporte de sacarose, do apoplasto para o simplasto dessas células, considerando que a baixa capacidade fotossintética das células-guarda (Gotow *et al.*, 1988) não poderia suprir os esqueletos carbônicos necessários à síntese dos íons malato e da sacarose encontrada nessas células (Outlaw, 1989; Lu *et al.*, 1997) e, assim, poderia ocorrer o influxo de sacarose via transportador de sacarose-H⁺ (Lu *et al.*, 1997; Ritte *et al.*, 1999).

A absorção de sacarose via transportador de sacarose-H⁺, pode ser um fator importante para os mecanismos moleculares de abertura estomática. Um trabalho anterior realizado em nosso laboratório (Antunes, 2009) gerou plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum*, nas quais o gene do transportador de sacarose (P62) foi expresso na orientação antisenso sob o controle do promotor do canal de potássio (*KST1*), que confere expressão gênica de forma específica em células-guarda. Tais plantas apresentaram menor condutância estomática e uma maior eficiência do uso da água, resultados associados ao menor conteúdo de sacarose nas células-guarda das plantas transformadas, reafirmando a importância da sacarose para o mecanismo estomático.

Assim, este trabalho ao mesmo tempo em que gera novas informações importantes para elucidar a regulação estomática, avalia também o potencial biotecnológico dos efeitos de modificações na expressão de vários genes na tolerância à seca.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antunes WC (2009) Engineering for desiccation postponement: antisense of sucrose transporter in tobacco specifically on guard cells results in reduced stomatal conductance and increased water use efficiency. Viçosa, UFV. 75 p (**Tese de Doutorado**)

Fan LM, Zhao Z, Assmann SM (2004) Guard cells: a dynamic signaling model. **Curr Opin Plant Biol** 7: 537-546

Gotow K, Taylor S, Zeiger E (1988) Photosynthetic carbon fixation in guard cell protoplasts from *Vicia faba* L.: evidence from radiolab experiments. **Plant Physiol** 86: 700-705

Hite D, Outlaw WH Jr, Tarczynski MC (1993) Elevated levels of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase in *Vicia* guard cells indicate cell-specific carbohydrate interconversions. **Plant Physiol** 101: 1217-1221

Lawson T (2009) Guard cell photosynthesis and stomatal function. **New Phytol** 181:13-34

Lu P, Zhang SQ, Outlaw Jr WH, Riddle KA (1995) Sucrose: a solute that accumulates in the guard-cell apoplast and guard-cell symplast of open stomata. **FEBS Let** 362: 180-184

Lu P, Outlaw WH, Smith BG, Freed GA (1997) A new mechanism for the regulation of stomatal aperture size in intact leaves. **Plant Physiol** 114:109-118

- Outlaw WH Jr (1983) Current concepts on the role of potassium in stomatal movements. **Physiol Plant** 59: 302-311
- Outlaw Jr WH (1989) Critical examination of the quantitative evidence for and against photosynthetic CO₂ fixation by guard cells. **Physiol Plant** 77: 275-281
- Outlaw Jr WH, Zhang S (2001) Single-cell dissection and microdroplet chemistry. **J Exp Bot** 52:605-614
- Outlaw Jr WH (2003) Integration of cellular and physiological functions of guard cells. **Crit Rev Plant Sci** 22: 503–529
- Ritte G, Rosenfeld J, Rohrig K, Raschke K (1999) Rates of sugar uptake by guard cell protoplasts of *Pisum sativum* L. related to the solute requirement for stomatal opening. **Plant Physiol** 121: 647–655
- Sayre JD (1926) Physiology of stomata of *Rumex patientia*. **Othio J Sci** 26: 233-266
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D (2001) Guard cell signal transduction. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 52: 627–658
- Taiz L, Zeiger E (2004) Fisiologia Vegetal. Traduzido por Eliane Romanato Santarém *et al*, 3ª Ed, Porto Alegre, Artmed
- Talbott LD, Zeiger E (1996) Central roles for potassium and sucrose in guard-cell osmoregulation. **Plant Physiol** 111: 1051–1057
- Talbott LD, Zeiger E (1998) The role of sucrose in guard cell osmoregulation. **J Exp Bot** 49: 329–337
- Wang P and Song CP (2008) Guard-cell signaling for hydrogen peroxide and abscísico acid. **New Phytol** 178: 703–718

CAPÍTULO I

EFEITO DA REDUÇÃO DO TRANSPORTE DA
SACAROSE NAS CÉLULAS-GUARDA NA
RESPOSTA AO ESTRESSE OSMÓTICO

RESUMO

PINHEIRO, Daniela Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2011. **Efeito da redução do transporte da sacarose nas células-guarda na resposta ao estresse osmótico.** Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-Orientadores: Werner Camargos Antunes e Thomas Christopher Rhys Williams.

Entre os fatores abióticos que limitam a produtividade das plantas destaca-se a disponibilidade hídrica do solo. Compreender os mecanismos pelos quais plantas respondem ao estresse hídrico é crucial para prever os impactos das alterações climáticas sobre a produtividade das culturas e dos ecossistemas. Plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas com vetor contendo construção antisense do gene do transportador de sacarose (P62) sob controle do promotor *KST1*, específico de células-guarda (CG), apresentam menor condutância estomática e um aumento na eficiência do uso da água comparada a plantas selvagens (WT), resultando em plantas com um menor consumo de água. O presente trabalho teve por objetivo caracterizar o efeito da redução na expressão do transportador de sacarose sobre as trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em plantas submetidas a déficit hídrico. Estresse osmótico produzido por cultivo em solução hidropônica contendo polietileno glicol (PEG) resultou em uma redução na área foliar total em todas as plantas, sendo esta redução menor nas plantas P62. A redução da fotossíntese (*A*) sob estresse osmótico, observada somente nas plantas não-transformadas, foi associada a uma menor condutância estomática (g_s) e redução da razão C_i/C_a . Porém, a taxa fotossintética de plantas WT a 2,0% de PEG, sob altas concentrações de CO_2 , foi reduzida em 31%, indicando que há uma limitação bioquímica do processo fotossintético produzida por este nível de estresse osmótico. Entretanto, esse fato não é explicado por danos oxidativos visto que não houve variação na taxa de peroxidação de lipídios. Não foram observadas diferenças nos parâmetros de fluorescência, F_v/F_m , $Y(II)$, ETR e q_P , para as plantas avaliadas, evidenciando que tanto plantas de genótipo selvagem quanto transgênica não apresentaram limitações no uso da energia de excitação para reações fotoquímicas. No entanto, plantas WT submetidas ao estresse osmótico (1,5% e 2,0% de PEG) apresentaram valores maiores de q_N , indicando uma maior dissipação térmica. Como conclusão, este trabalho sugere que reduções no transporte de sacarose pode contribuir para maior

tolerância ao estresse osmótico e maior eficiência do uso da água. Este trabalho sugere que a sacarose tem um importante papel na regulação estomática e que alterações no seu metabolismo especificamente em células-guarda poderiam contribuir para o crescimento e sobrevivência sob condições hídricas desfavoráveis, além de abrir caminhos para novas estratégias na obtenção de plantas mais eficientes no uso da água.

ABSTRACT

PINHEIRO, Daniela Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2011. **Effects of the reduction in sucrose transport in guard-cells on the responses to osmotic stress.** Adviser: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-Advisers: Werner Camargos Antunes and Thomas Christopher Rhys Williams.

Among the abiotic factors that limit plant productivity soil water availability stands out. Understanding the mechanisms by which plants respond to drought stress is crucial for predicting the impacts of climate change on crop productivity and ecosystems. Plants of *Nicotiana tabacum* transformed with an antisense gene construct targeted against the plasma membrane sucrose transporter (P62) and containing the guard cell (GC) specific promoter KST1 exhibit lower stomatal conductance and higher water use efficiency compared to wild type plants (WT), resulting in plants with lower water consumption. This study aimed to characterize the effect of reduction in the expression of this sucrose transporter on gas exchange and chlorophyll-*a* fluorescence in plants subjected to water deficit. Osmotic stress produced by cultivation under hidroponic solution in the presence of PEG resulted in a reduction in total leaf area in all plants, being this reduction lower in P62 plants. Under stress conditions, the reduction in photosynthesis (*A*), observed only in non-transformed plants, was associated with lower stomatal conductance (g_s) and reduction of C_i/C_a . Nevertheless, the WT photosynthetic rate during 2.0% PEG treatment and under high CO₂ concentrations was reduced by 31%, indicating that there is a biochemical limitation of photosynthesis produced by this level of osmotic stress. However, this observation is not explained by oxidative damage as there was no change in the level of lipid peroxidation. There were no differences in F_v/F_m , $Y(II)$, ETR and q_P , for the plants assessed, showing that neither wild type nor transgenic plants exhibit limitations in the use of excitation energy for photochemical reactions. However, WT plants subjected to osmotic stress (1.5% and 2.0% PEG) showed higher values of q_N , indicating a higher thermal dissipation. As conclusion, this work suggests that reductions in sucrose transport could contribute for higher tolerance to osmotic stress and water use efficiency. This work suggests that sucrose has an important role in stomatal regulation and that changes in its metabolism specifically in guard cells could contribute to the growth and survival under adverse

water conditions, and open avenues for new strategies to obtain plants with higher water use efficiency.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a sociedade mundial se depara com muitos desafios. Há a preocupação de que a agricultura, num futuro não muito distante, possa não ser capaz de produzir os alimentos necessários para alimentar uma população mundial, que continua crescendo, a níveis suficientes para se ter uma vida saudável e ativa. De acordo com as pesquisas da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), a população mundial em 2050 será de 9,1 bilhões de pessoas, 34% superior a atual, sendo que cerca de 70% da população mundial será urbana (em comparação com 49% hoje). Para alimentar esta maior e mais urbana população, a produção agrícola deve aumentar em 70%. Além disso, a disponibilidade de água para a agricultura tem se tornado cada vez mais limitada. As mudanças climáticas e o aumento da produção de biocombustíveis podem agravar a situação, aumentando-se a demanda por uma maior produção agrícola com um menor consumo de água.

A seca ou déficit hídrico contínuo é um dos fatores que mais afetam o crescimento, desenvolvimento, sobrevivência e produtividade das culturas. Diante das perspectivas futuras supracitadas, torna-se necessário o desenvolvimento de variedades de plantas cultivadas com menor demanda por água e com maior tolerância à seca. A obtenção de plantas com maior eficiência do uso da água é uma importante estratégia para assegurar uma produção que atenda a necessidade crescente de recursos agrícolas.

Uma das respostas mais importantes das plantas às variações da disponibilidade hídrica do solo é a redução da abertura estomática, alterando, assim, a perda de água das folhas. Na medida em que a água torna-se limitante, com o fechamento estomático, ocorre uma limitação no dióxido de carbono disponível para fixação da fotossíntese e como resultado um decréscimo na eficiência quântica e um excesso de energia nos centros de reação dos fotossistemas, envolvendo a formação de espécies reativas de oxigênio que causam peroxidação de lipídeos, danos celulares, inativação de enzimas do ciclo de Calvin, entre outros (Tambussi *et al.*, 2000).

Recentemente, em nosso laboratório, Antunes (2009) demonstrou que plantas transgênicas de tabaco com redução na expressão do transportador de sacarose (P62) de forma específica em células-guarda, apresentam menor condutância estomática e um aumento na eficiência do uso da água, resultando em plantas com um menor consumo de água. Além disso, tem-se verificado que a sacarose sintase, SuSy,

enzima de degradação da sacarose, tem sua expressão aumentada na célula-guarda sob estresse hídrico, e esta resposta é específica para este tipo de célula (Kopka, 1997). Estes resultados sugerem que o metabolismo da sacarose em células-guarda pode contribuir significativamente para a regulação da abertura estomática. Entretanto, a importância relativa dos solutos envolvidos na osmorregulação da célula-guarda tem sido tema de debates, de maneira que ainda não existe um consenso no que se refere à importância da sacarose no mecanismo de osmorregulação das células estomáticas (Talbot e Zeiger, 1996; Outlaw e Zhang, 2001; Lawson, 2009).

Frente aos estudos envolvendo a sacarose com os movimentos estomáticos, há a necessidade de caracterizar a inter-relação entre o transporte e metabolismo de sacarose de forma a melhor compreender a rede de respostas das células-guarda no controle da transpiração. Além de pormenorizar e comprovar o fenótipo de que a manipulação do metabolismo de sacarose na célula-guarda permite regular a transpiração de forma a obter-se plantas mais tolerantes à seca.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal e Condições Experimentais

Plantas de *Nicotiana tabacum* foram previamente transformadas por Antunes (2009), em nosso laboratório, com uma construção, em vetor pBinAR-Kan, contendo o gene para o Transportador de Sacarose (P62) de batata (X69165), clonado na orientação antisenso, com expressão específica em células-guarda dirigida pelo promotor do gene do canal de potássio, *KST1* (Plesch *et al.*, 2001).

Sementes de tabaco selvagem (WT - *wild type*) e a linhagem transgênica 9 (L9) foram esterilizadas com álcool 70% por 1 min, seguido por solução de 2% de hipoclorito de sódio por 5 min e três passos de lavagem com água destilada estéril. As sementes, então, foram germinadas em placas de Petri contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de sacarose 30 g L⁻¹ e canamicina 100 mg L⁻¹.

As plântulas foram transplantadas para potes plásticos de 300 cm³ com substrato comercial e mantidas a 25°C sob um fotoperíodo de 14 h com 250 μmol fótons m⁻²s⁻¹. Posteriormente essas plantas foram aclimatadas em casa de vegetação na Unidade de Crescimento de Plantas da Universidade Federal de Viçosa.

2.2. Condições experimentais em hidroponia

Plantas com aproximadamente 45 dias foram submetidas a um experimento em sistema hidropônico em delineamento em blocos casualizados, com cinco repetições formando um esquema em fatorial 2 x 2 (dois genótipos - planta selvagem e transgênica P62, e dois tratamentos - controle e estresse osmótico induzido por PEG).

As plantas foram transplantadas para caixas com 5 litros de solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950), cujo pH da solução foi corrigido diariamente para 5,5.

O tratamento foi de simulação de estresse osmótico com aplicação de polietileno glicol 6000 (PEG), para a indução da deficiência hídrica. O estresse foi induzido pela adição gradativa de PEG-6000 à solução de Hoagland nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 %, cuja troca de solução e avaliação das trocas gasosas e de fluorescência foi realizada a cada quatro dias. As concentrações de PEG utilizadas nesse experimento foram ajustadas a partir de testes preliminares.

2.3. Área Foliar total

Como parâmetro de crescimento, foi determinada a área foliar total (A) das plantas de tabaco no quarto dia após a aplicação de cada tratamento através das medidas de comprimento (C) e largura (L) de cada folha. A área foliar foi estimada usando um modelo similar ao proposto para a área foliar de café (Antunes *et al.*, 2008) e adaptado para tabaco por Antunes (2009):

$$\text{Equação: Área foliar (cm}^2\text{)} = 0,700138211 \times (C \times L)$$

$$\text{Coeficiente ajustado de determinação múltipla, } R^2_a = 0,9952$$

2.4. Caracterização de parâmetros de Trocas Gasosas e Fluorescência da clorofila *a*

A caracterização dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foi realizada em folhas completamente expandidas utilizando-se um analisador de gases a infravermelho (IRGA, LICOR 6000, Li-COR, Lincoln, Nebraska, EUA) sob temperatura e vapor de água ambientes.

Os parâmetros de fotossíntese líquida (A , $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mmol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), transpiração (E , $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e razão C_i/C_a foram determinados entre 08h30 e 10h30, horário de maior abertura estomática, sob intensidade de fluxo fotônico de $1000 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

As medições de fluorescência realizadas na antemanhã (05h00) determinaram a fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m), fluorescência variável ($F_v=F_m-F_0$), e rendimento quântico máximo potencial do fotossistema II (F_v/F_m), parâmetros estes determinados em condições de escuro. Os parâmetros de fluorescência da clorofila a em folhas adaptadas à luz foram analisados conjuntamente após cada medida de trocas gasosas. Dentre esses parâmetros, foram determinados:

- Fluorescência máxima de folhas adaptadas à luz: F_m ;
- Fluorescência constante: F_s ;
- Fluorescência mínima estimada de folhas adaptadas à luz: $F_0' = F_0/(F_v/F_m + F_0/F_m')$ (Oxborough e Baker, 1997);
- Rendimento quântico efetivo do fotossistema II: $Y(\text{II}) = (F_m' - F_s) / F_m'$ (Genty, 1989);
- Taxa de transporte de elétrons: $\text{ETR} = Y(\text{II}) \times \text{RFA} \times 0,5 \times 0,84$ (RFA= radiação fotossinteticamente ativa) (Genty, 1989);
- Coeficiente de extinção fotoquímico: $q_P = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$ (Oxborough e Baker, 1997);
- Coeficiente de extinção não-fotoquímico: $q_N = F_m - F_m' / F_v$ (Bilger e Schreiber, 1986).

A avaliação das trocas gasosas e fluorescência da clorofila a foram realizadas sob concentração de CO_2 tanto ambiente ($380 \mu\text{L}$ de $\text{CO}_2 \text{L}^{-1}$) quanto saturante ($1500 \mu\text{L}$ de $\text{CO}_2 \text{L}^{-1}$).

2.5. Determinação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi quantificada através da determinação de aldeído malônico (MDA) formado, de acordo com Ortigosa (2010) e Hodges (1999). Amostras liofilizadas de folha (50 mg) coletadas ao fim do experimento foram maceradas em nitrogênio líquido, seguido pela adição de 2,0 mL da solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 15

minutos a 4 °C. 250 µL do extrato sobrenadante foram adicionados a 1,0 mL de solução de TCA 20% (p/v) contendo 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA). Como controle negativo, outros 250µL do extrato foram adicionados a 1,0 mL da solução de TCA 20% sem ácido tiobarbitúrico. As amostras foram misturadas vigorosamente e incubadas a 95 °C por 30 minutos, com a reação paralisada no gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para a leitura a 532 nm. O valor da absorvância não-específica a 600 nm foi subtraído e a concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expressa em $\text{nmol.g}^{-1} \text{ MS}$.

2.6. Análise termográfica de infravermelho

As imagens de termografia foram obtidas usando uma câmera termal a infravermelho modelo FLIR T360 (resolução 320x240 pixels) e os dados analisados pelo software FLIR QuickReport 1.2. A captação das imagens foi realizada no mesmo horário e dias de análise de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*.

2.7. Delineamento experimental e análise estatística

As análises estatísticas foram feitas, com base no delineamento em blocos casualizados, com dois tratamentos e cinco repetições, formando um esquema fatorial 2 x 2 – dois genótipos (WT e P62 L9) sob duas condições de cultivo, solução nutritiva de Hoagland com e sem adição de polietileno glicol (PEG).

Realizou-se análise de variância (ANOVA) dos dados à significância de 5% de probabilidade. As médias foram agrupadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade com o auxílio do programa STATISTICA 7.0.

3 RESULTADOS

3.1. Análise do crescimento

As plantas de *Nicotiana tabacum*, genótipos selvagem (WT) e transgênica expressando construção antisense para o transportador de sacarose (P62 L9), cultivadas em sistema hidropônico, foram submetidas a tratamentos com um

contínuo e crescente estresse osmótico (diferentes concentrações de PEG – 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% de PEG).

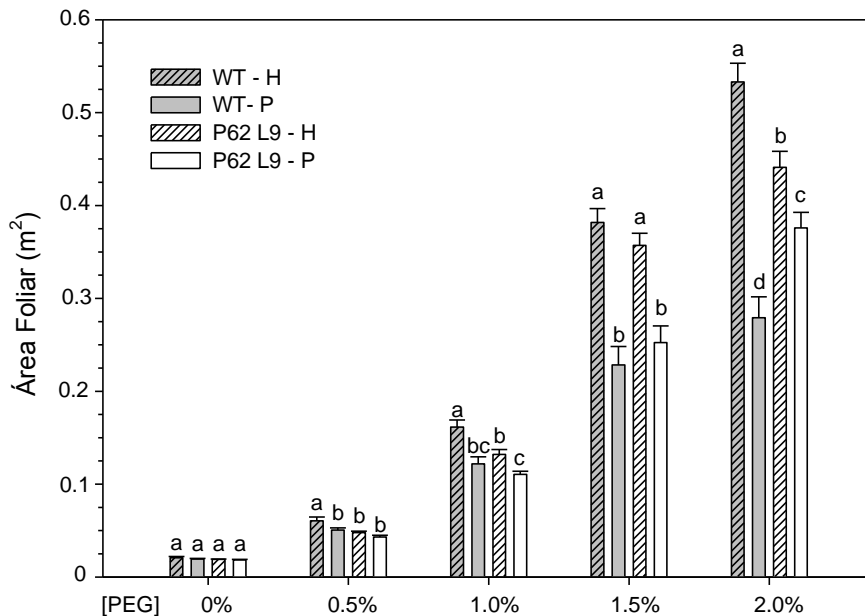


Figura 3: Efeito do estresse osmótico na área foliar de plantas de tabaco do tipo selvagem (WT) e transgênica (P62 L9) cultivadas em sistema hidropônico. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (H) ou em solução nutritiva adicionada de PEG 6000 (P). Letras diferentes denotam diferenças estatísticas entre médias de um mesmo tratamento (Teste de Tukey, $P < 0,05$). Os dados representam a média \pm erro padrão ($n=5$).

Sob condições controle (solução nutritiva de Hoagland), a área foliar das plantas transgênicas foi geralmente menor que plantas WT (Fig. 3). A aplicação de PEG resultou em uma redução na área foliar total em todas as plantas, entretanto foi mais pronunciada nas plantas WT (48% para WT e 15% para P62).

3.2. Análise das trocas gasosas

Nas concentrações de 1,5% ($\Psi_s = - 0,10$ MPa) e 2,0% ($\Psi_s = - 0,14$ MPa) de PEG, plantas WT sofreram reduções na taxa fotossintética (A) de 36% e 39%, respectivamente, enquanto as plantas transgênicas não foram afetadas (Fig. 4A). O mesmo padrão foi observado na condutância estomática (g_s) (Fig. 4B). Sob estresse osmótico (1,5 e 2,0%), somente nas plantas WT foi observada reduções significativas

em g_s (53% e 52%) enquanto a linha P62 L9 apresentou redução somente a 2,0% de PEG (35%).

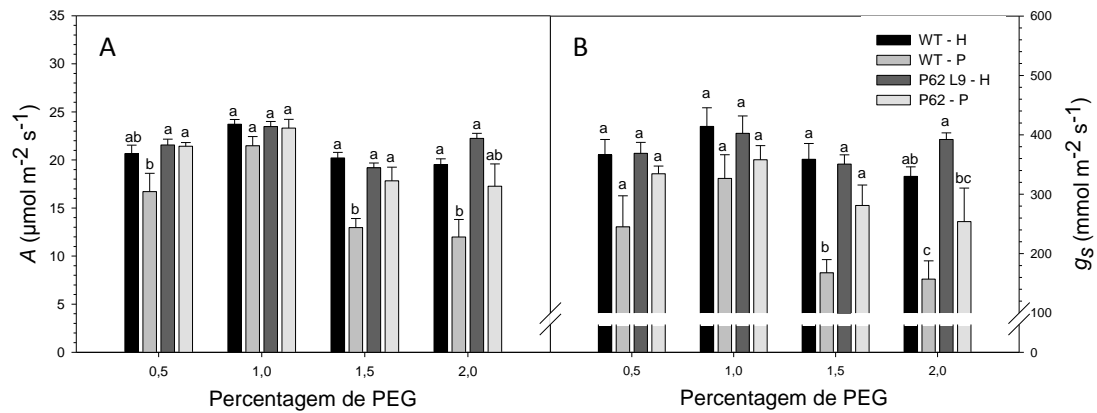


Figura 4: Taxa de assimilação líquida de carbono (A) e condutância estomática (g_s) em *Nicotiana tabacum* selvagem (WT) e transgênica (P62 L9) cultivadas em sistema hidropônico. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (H) ou em solução nutritiva de Hoagland adicionada de PEG 6000 (P). Letras diferentes denotam diferenças estatísticas entre médias de um mesmo tratamento (Teste de Tukey, $P < 0,05$). Os dados representam a média \pm erro padrão (n=5).

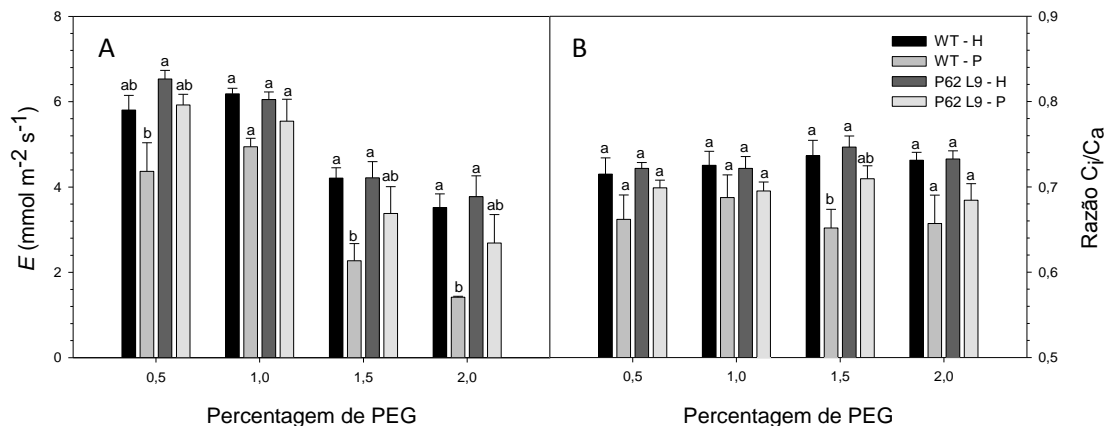


Figura 5: Taxa de transpiração (E) e razão entre a concentração interna (C_i) e ambiente (C_a) de CO_2 em *Nicotiana tabacum* do tipo selvagem (WT) e transgênica (P62 L9) cultivadas em sistema hidropônico. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (H) ou em solução nutritiva de Hoagland adicionada de PEG 6000 (P). Letras diferentes denotam diferenças estatísticas entre médias de um mesmo tratamento (Teste de Tukey, $P < 0,05$). Os dados representam a média \pm erro padrão (n=5).

Da mesma forma, somente as plantas WT apresentaram reduções de 46% e 60% em sua transpiração, o que foi associado à menor g_s nos tratamentos de 1,5% e 2,0% de PEG nas plantas WT. (Fig. 5A).

A razão entre as concentrações de CO_2 na câmara subestomática (C_i) e a ambiente (C_a) (Fig. 5B) diminuiu somente em WT sob estresse osmótico (1,5% de PEG).

A fim de avaliar como as limitações difusivas impostas pelas reduções em g_s sob PEG contribuíram para a redução das taxas fotossintéticas, foi realizado uma análise de trocas gasosas sob condições saturantes de CO_2 ($1500 \mu\text{L L}^{-1}$). Na ausência de limitação difusiva, plantas WT, mesmo sob concentrações saturantes, ainda apresentaram redução de 31% de A na presença de 2,0% de PEG, enquanto a redução de plantas transgênicas foi de apenas 9% (Fig. 6).

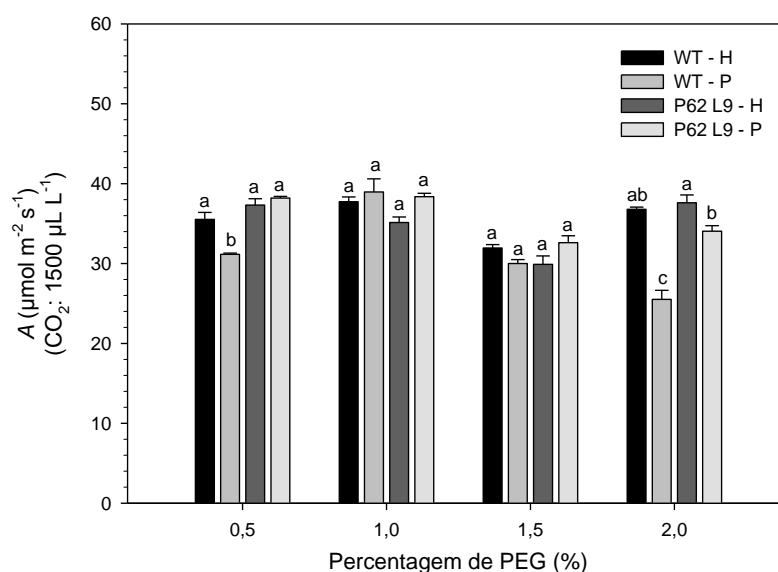


Figura 6: Taxa fotossintética sob alta concentração de CO_2 ($1500 \mu\text{L.L}^{-1}$) de plantas de tabaco do tipo selvagem (WT) e transgênica (P62 L9). As plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (H) ou em solução nutritiva de Hoagland adicionada de PEG 6000 (P). Letras diferentes denotam diferenças estatísticas entre médias de um mesmo tratamento (Teste de Tukey, $P < 0,05$). Os dados representam a média \pm erro padrão ($n=5$).

3.3. Parâmetros de fluorescência da clorofila a

De forma a verificar se a menor redução em A nas plantas transgênicas foi afetada por efeitos nas reações fotoquímicas, foi estudado o efeito do estresse osmótico nos parâmetros de fluorescência.

Nenhuma alteração significativa foi observada no rendimento quântico potencial do fotossistema II (FSII) (F_v/F_m) após a aplicação de PEG (Fig. 7).

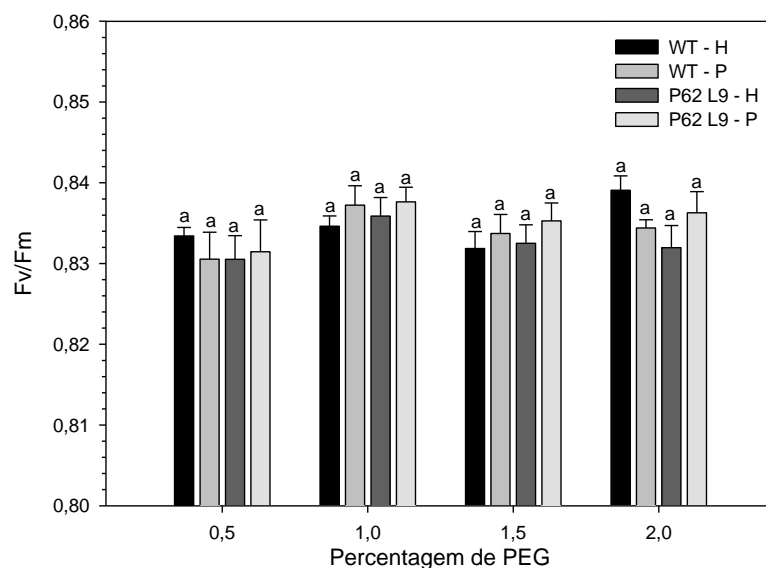


Figura 7: Rendimento quântico máximo potencial do FSII (Fv/Fm) de plantas de tabaco do tipo selvagem (WT) e transgênica (P62 L9) sob diferentes concentrações de PEG. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (H) ou em solução nutritiva adicionada de PEG 6000 (P). Letras diferentes denotam diferenças estatísticas entre médias de um mesmo tratamento (Teste de Tukey, $P < 0,05$). Os dados representam a média \pm erro padrão ($n=5$).

A taxa de transporte de elétrons (ETR) e o rendimento quântico efetivo do FSII (Y(II)) não apresentaram variações entre plantas WT e transgênicas sob condições de estresse osmótico na maior parte dos tratamentos (Fig. 8), com exceção da aplicação inicial de 0,5% de PEG, na qual plantas transformadas sob PEG apresentaram maiores valores que plantas selvagens cultivadas em solução nutritiva (P value $< 0,05$).

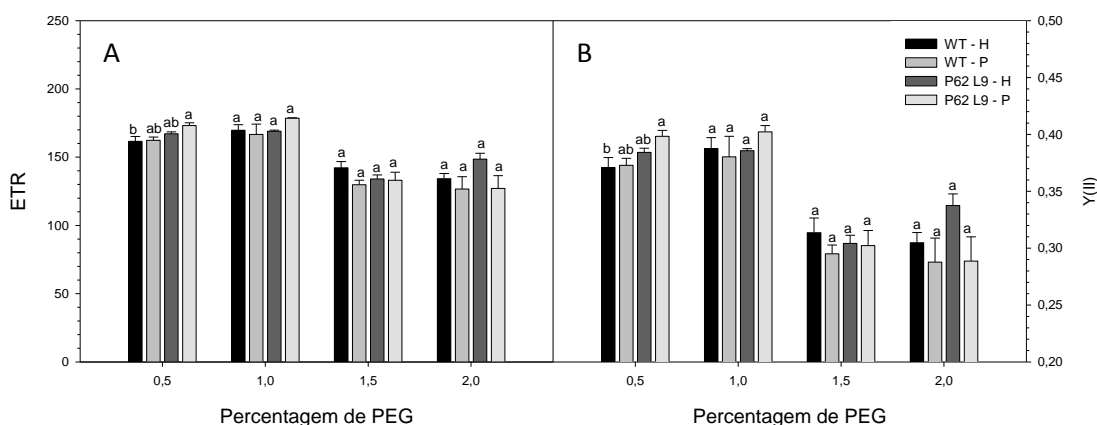


Figura 8: Taxa de transporte de elétrons (ETR) e rendimento quântico efetivo do FSII ($Y(II)$) de plantas de tabaco do tipo selvagem (WT) e transgênica (P62 L9). As plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (H) ou em solução nutritiva adicionada de PEG 6000 (P). Letras diferentes denotam diferenças estatísticas entre médias de um mesmo tratamento (Teste de Tukey, $P<0,05$). Os dados representam a média \pm erro padrão ($n=5$).

Plantas não-transformadas e transgênicas não apresentaram diferenças estatísticas entre si dentro dos tratamentos para a análise do coeficiente de extinção fotoquímico (q_P) (Fig. 9A). No entanto, pode se observar uma elevação do coeficiente de extinção não-fotoquímico (q_N), a qual foi significativa somente nas plantas selvagens submetidas ao estresse osmótico (Fig. 9B).

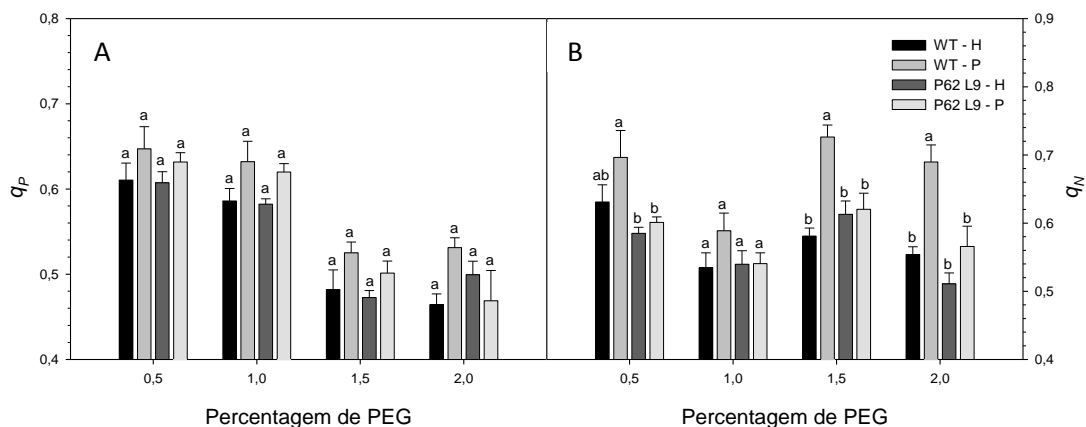


Figura 9: Coeficiente de extinção fotoquímico (q_P) e não-fotoquímico (q_N) de plantas de tabaco do tipo selvagem (WT) e transgênica (P62 L9). As plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (H) ou em solução nutritiva adicionada de PEG 6000 (P). Letras diferentes denotam diferenças estatísticas entre médias de um mesmo tratamento (Teste de Tukey, $P<0,05$). Os dados representam a média \pm erro padrão ($n=5$).

3.4. Peroxidação de lipídios

Ao final do experimento (tratamento de 2% de PEG), amostras de folha foram submetidas à quantificação de aldeído malônico (MDA). O estresse osmótico não causou dano oxidativo nas membranas (Fig. 10), apenas um ligeiro aumento no conteúdo de MDA da planta transgênica sob PEG em relação à WT controle.

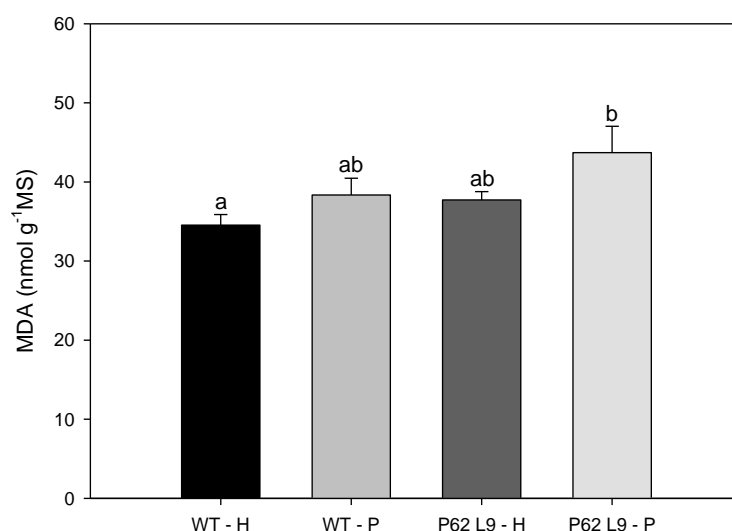


Figura 10: Acúmulo de aldeído malônico (MDA) (nmol g⁻¹ de matéria seca – MS) em plantas de *N. tabacum* selvagem (WT) e transgênica (P62 L9). As plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (H) ou em solução nutritiva adicionada de PEG 6000 (P). Letras diferentes denotam diferenças estatísticas entre médias de um mesmo tratamento (Teste de Tukey, P<0,05). Os dados representam a média ± erro padrão (n=5).

3.5. Termografia de infravermelho

Plantas sob estresse osmótico apresentaram áreas foliares com temperaturas maiores que aquelas mantidas somente em solução nutritiva de Hoagland (Fig. 11). No entanto, imagens termais das plantas de tabaco demonstram que folhas de WT sob estresse de 1,5% de PEG possuem maiores áreas com altas temperaturas (regiões avermelhadas) comparadas às plantas transgênicas na área do limbo da folha, enquanto as maiores temperaturas nas plantas transgênicas foram restritas a região das nervuras.

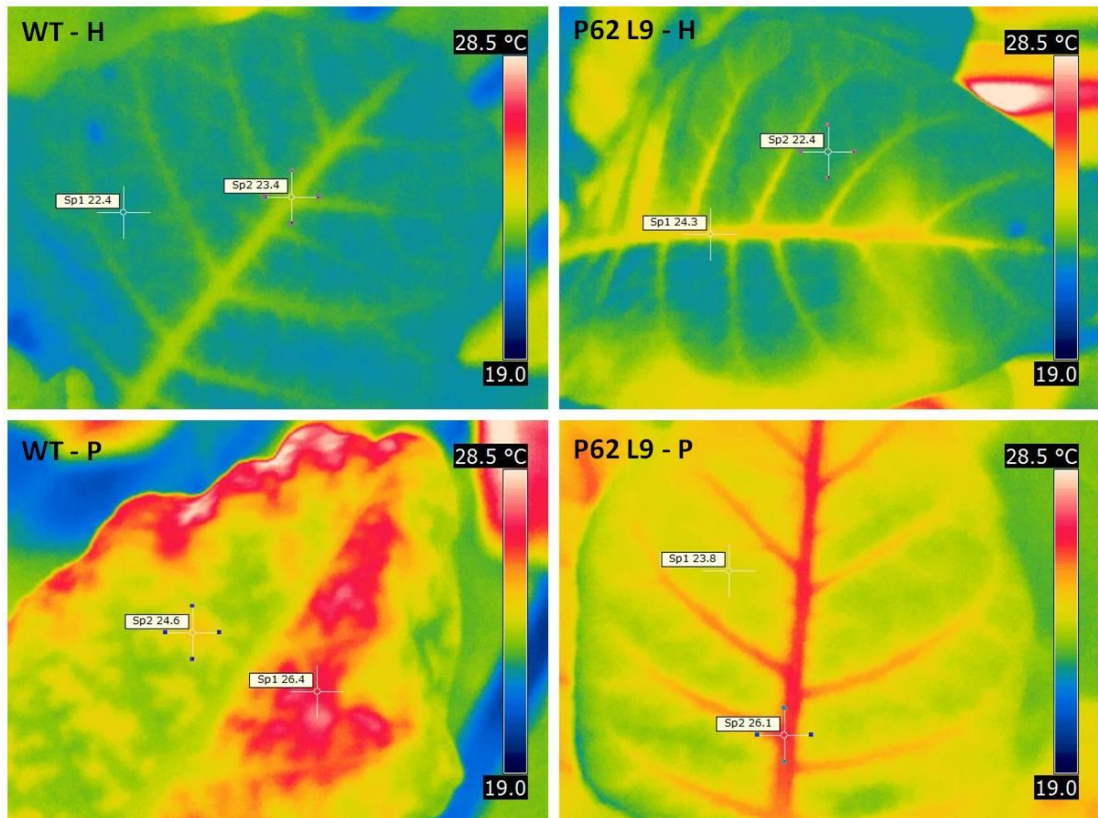


Figura 11: Imagem de termografia de infravermelho mostrando diferenças de temperatura entre plantas de *N. tabacum* selvagem (WT) e transgênica (P62 L9). As plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (H) ou em solução nutritiva adicionada de 1,5% de PEG 6000 (P).

4 DISCUSSÃO

4.1. Efeito do estresse osmótico induzido por PEG no crescimento e nas trocas gasosas

A expansão foliar é um processo extremamente sensível ao déficit hídrico. À medida que decresce o conteúdo de água da planta, as células perdem parte da pressão de turgidez contra as paredes celulares, limitando o processo de alongamento celular (Raí e Takabe, 2006). A aplicação de PEG em sistemas hidropônicos induz um estresse hídrico devido à redução do potencial osmótico e, conseqüentemente, potencial hídrico da solução nutritiva e, assim, reduz a disponibilidade de água para absorção das plantas.

As plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* expressando construção antisense para o transportador de sacarose (P62 L9), sob condições de estresse osmótico, apresentaram uma menor redução na área foliar total comparada às plantas de genótipo selvagem (WT). Antunes (2009) mostrou que plantas P62 apresentam

reduções no crescimento sob condições controle, além de exibirem reduzido consumo de água sob condições irrigadas e melhor eficiência do uso da água sob seca no solo. Como pôde ser observado ao fim do experimento, plantas WT apresentaram maior área foliar sob condições controle, porém as plantas transgênicas cresceram melhor sob estresse osmótico. Nos resultados de Antunes (2009), também foi observado que na ausência de estresse as plantas P62 apresentavam menor fotossíntese e área foliar. Embora medidas pontuais da condutância estomática e transpiração no presente experimento não detectaram diferenças entre estas plantas, dados anteriores baseados em composição isotópica do ^{13}C e de dinâmica da condutância estomática, mostram que os estômatos das plantas transgênicas ficam mais fechados durante o dia (Antunes, 2009). Considerando estes dados em conjunto com os dados anteriores de nosso grupo, pode-se sugerir que o menor conteúdo de sacarose em células-guarda resultou na capacidade de retardar a dessecação, ou seja, aumentou-se a capacidade de manter a hidratação de seus tecidos e, assim, minimizar a perda de água em situações de estresse, característica que pode ter grande importância biotecnológica para a obtenção de plantas com maior eficiência do uso da água (Condon *et al.*, 2004). Tais diferenças na área foliar total podem ser explicadas, em parte, pelas alterações na atividade fotossintética. Portanto, plantas transgênicas sob PEG foram eficientes em manter altas taxas de assimilação de CO_2 , enquanto plantas WT sofreram reduções mais pronunciadas (Fig. 4).

A redução da fotossíntese sob estresse osmótico de 1,5% de PEG, observada somente nas plantas não-transformadas, foi associada a uma menor condutância estomática e redução da razão C_i/C_a , última redução a qual não foi significativa quando 2,0% de PEG foi utilizado. O menor g_s e transpiração foram associados a uma maior temperatura foliar, como revelado na imagem termográfica destas plantas, quando comparada com as transgênicas.

O efeito do estresse sobre a condutância estomática pode ser eliminado pelo suprimento de CO_2 em altas concentrações, pois, dessa maneira, as barreiras difusionais passam a ser desprezíveis. Entretanto, mesmo sob concentrações saturantes de CO_2 , plantas WT apresentaram reduções de 31% de A na presença de 2,0% de PEG, enquanto a redução de plantas transgênicas foi de apenas 9%, denotando uma possível limitação bioquímica da fotossíntese, principalmente em plantas WT.

4.2. Efeito do estresse osmótico induzido por PEG nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*

Atualmente, o uso dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* para analisar o perfil fotossintético sob estresse tem sido amplamente utilizado em estudos fisiológicos e ecofisiológicos por ser um método sensível e não-invasivo (Bolhàr-Nordenkampf e Öquist, 1993).

Embora a melhor maneira de se avaliar a ocorrência ou não de fotoinibição quando plantas são submetidas a condições estressantes seja via determinação de qI (coeficiente de extinção fotoinibitório) (Lichtenthaler, 2005), oriundo da decomposição de q_N , o rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) também é uma análise sensível para tal objetivo. Esse parâmetro refere-se à máxima eficiência na qual a energia absorvida pelo fotossistema II (PSII) é utilizada para a redução de um aceptor primário de elétrons (Q_A) (Baker, 2008). As plantas sob condições controle e sob estresse não apresentaram diferenças significativas para F_v/F_m , evidenciando ausência de fotoinibição.

O rendimento quântico efetivo do PSII ($Y(II)$) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) das plantas não-transformadas e transgênicas não apresentaram diferenças significativas. O $Y(II)$ mede a proporção de energia luminosa absorvida pela clorofila associada ao PSII que está sendo de fato utilizado para a redução do *pool* de Q_A , sendo um bom indicativo do comprometimento da etapa fotoquímica da fotossíntese. Já a taxa linear de transporte de elétrons (ETR) está relacionada diretamente com a resposta do rendimento quântico efetivo do PSII ($Y(II)$) à determinada densidade de fluxo de fótons (Maxwell e Johnson, 2000). O fato de que a exposição de plantas WT e P62 ao estresse osmótico pela adição de PEG à solução nutritiva não promoveu alteração em $Y(II)$ ou ETR, sugere que este estresse não foi associado a um comprometimento da etapa fotoquímica da fotossíntese, que é a fase responsável pela absorção de energia luminosa e transferência de elétrons pelos fotossistemas I e II para a produção de ATP e NADPH.

Apesar de ser um conceito similar a $Y(II)$, o *quenching* fotoquímico (q_P) é um parâmetro diferente. Enquanto $Y(II)$ é a proporção de energia absorvida sendo utilizada na etapa fotoquímica da fotossíntese, q_P oferece uma indicação da proporção de centros de reação do PSII que estão abertos, ou seja, oxidados e capazes de serem reduzidos pela transferência de elétrons (Maxwell e Johnson, 2000). Somando-se aos resultados de F_v/F_m , $Y(II)$ e ETR, não foi observado

diferenças em q_P , evidenciando que tanto plantas de genótipo selvagem quanto transgênica com redução na expressão de um transportador de sacarose especificamente em células-guarda não apresentaram limitações no uso da energia de excitação para reações fotoquímicas.

A grande diferença entre os genótipos no que concerne aos parâmetros fotoquímicos, está no coeficiente de extinção não-fotoquímico (ou *quenching* não-fotoquímico, q_N), pois plantas selvagens submetidas ao estresse osmótico (1,5% e 2,0% de PEG) apresentaram valores maiores que plantas P62 sob condições controle e sob estresse.

O *quenching* não-fotoquímico representa a forma pela qual o excesso de energia luminosa é dissipado por calor. Os maiores valores encontrados em WT para q_N sob condições de estresse indicam que a planta selvagem dissipa mais energia térmica não utilizada nas reações fotoquímicas. Essa diferença na dissipação não-fotoquímica sugere um mecanismo de aclimação em WT, de forma a permitir uma maior proteção do aparato fotossintético, contribuindo para manter em níveis normais a eficiência quântica de conversão fotoquímica da energia absorvida, sem reduções no transporte de elétrons.

4.3. Efeito do estresse osmótico induzido por PEG na peroxidação de lipídios e na termometria de infravermelho

A peroxidação de lipídeos gera o aldeído malônico (MDA), que é um produto da decomposição de ácidos graxos das bicamadas lipídicas da célula e é uma forma de atestar a presença de radicais livres (Munné-Bosch, 2002) e estimar o dano oxidativo.

Sob déficit hídrico, o aparecimento de dano oxidativo pode ocorrer devido às limitações na assimilação de CO_2 , resultando na produção excessiva de poder redutor e ATP. Parte desse excesso pode ser utilizado na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), potencialmente capazes de resultar em danos fotoinibitórios e fotooxidativos (Smirnoff, 1995; Asada, 1999).

Plantas selvagens e transgênicas não exibiram aumento na quantidade de MDA na presença de estresse osmótico, o que é condizente com os dados de fluorescência da clorofila *a*, uma vez que os resultados de F_v/F_m , $Y(\text{II})$, ETR e q_P

indicam que não há fotoinibição nem comprometimento da etapa fotoquímica da fotossíntese.

A taxa fotossintética de plantas WT a 2,0% de PEG, sob altas concentrações de CO₂, foi ainda reduzida em 31% e indicando que há uma limitação bioquímica do processo fotossintético produzida por este nível de estresse osmótico. Porém, esse fato não é explicado por fotoinibição ou por danos oxidativos nas células devido a indução da produção de EROs. Possivelmente, a maior limitação, neste caso, seja nas etapas posteriores à fotoquímica como a carboxilação e reações do ciclo de Calvin, fato comum quando plantas são submetidas a condições severas de estresse (Galmés, 2007; Flexas, 2010; Gilbert, 2011).

Para proteção da maquinaria fotossintética contra estresses oxidativos, as plantas precisam dissipar o excesso de energia luminosa absorvida, o que pode ser alcançado mediante aumento nos níveis de xantofilas e carotenos ou por atuação do sistema de defesa antioxidativo (Asada, 1999). O ciclo das xantofilas está intimamente ligado ao processo de dissipação térmica da energia de excitação absorvida pelo sistema antena coletor de luz do fotossistema II (Horton, 2005). O maior q_N nestas plantas poderia estar associado ao aumento do fluxo de elétrons através do ciclo das xantofilas. Adicionalmente, quando se analisa o perfil de distribuição de temperaturas em folhas de plantas selvagem e transgênicas, a maior temperatura observada em extensas áreas do limbo foliar somente nas plantas controle, pode ser devido à menor transpiração nestas plantas, como observado por Antunes (2009). Observa-se também, neste trabalho que o estresse hídrico produziu maiores reduções na condutância estomática nas plantas WT. Desta forma, pode ser que o maior q_N nestas plantas seja uma forma de compensar a provável menor condutância estomática, e que a mesma também contribua para a maior temperatura foliar observada nestas plantas.

Estes resultados sugerem que as plantas P62 L9 sob estresse osmótico severo, por terem um comportamento estomático alterado, não apresentaram evidências de uma redução bioquímica da fotossíntese, apresentando maior capacidade de dissipação de calor, e menor atividade do *quenching* não-fotoquímico. Em consequência, pode-se sugerir que o maior crescimento foliar nestas plantas transgênicas sob estresse pode ser devido a menores limitações bioquímicas de sua fotossíntese, como observado sob condições saturantes de CO₂.

5 CONCLUSÃO

A baixa expressão do transportador de sacarose com expressão específica em células-guarda permitiu que tais plantas fossem capazes de manter uma mais alta taxa fotossintética sob condições de estresse osmótico, com redução menor no crescimento. Este trabalho sugere que a sacarose tem um importante papel na regulação estomática e que alterações no seu metabolismo especificamente em células-guarda poderiam contribuir para o crescimento e sobrevivência sob condições hídricas desfavoráveis, além de abrir caminhos para novas estratégias na obtenção de plantas mais eficientes no uso da água.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antunes WC, Pompelli MF, Carretero DM, DaMatta FM (2008) Allometric models for non-destructive leaf area estimation in coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*). **Ann Appl Biol** 153: 33–40
- Antunes WC (2009) Engineering for desiccation postponement: antisense of sucrose transporter in tobacco specifically on guard cells results in reduced stomatal conductance and increased water use efficiency. Viçosa, UFV. 75 p (**Tese de Doutorado**)
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annu Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol** 50: 601-639
- Baker NR (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annu Rev Plant Biol**. 59: 89-113
- Bilger W, Schreiber U (1986) Energy-dependent quenching of dark level chlorophyll fluorescence in intact leaves. **Photosynth Res** 10: 303-308
- Bolhàr-Nordenkampf HR, Öquist GO (1993). Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Hall, DO; Scurlock, JMO; Bolhàr-Nordenkampf, HR;

- Leegood, RC; Long, SP (eds.). *Photosynthesis and production in a changing environment*. Chapman & Hall, London, pp. 193-205
- Condon AG, Richards RA, Rebetzke GJ, Farquhar GD (2004) Breeding for high water-use efficiency. **J Exp Bot** 55: 2447-2460
- Flexas J, Galmés J, Gallé A, Gulías J, Pou A, Ribas-Carbo M, Tomàs M, Medrano, H. (2010) Improving water use efficiency in grapevines: potential physiological targets for biotechnological improvement. **Australian Journal of Grape and Wine Research** 16: 106–121.
- Galmés J, Medrano H & Flexas J (2007) Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. **The New Phytologist** 175: 81–93.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochim Biophys Acta** 990: 87-92
- Gilbert ME, Zwieniecki MA, Holbrook NM (2011) Independent variation in photosynthetic capacity and stomatal conductance leads to differences in intrinsic water use efficiency in 11 soybean genotypes before and during mild drought. **J Exp Bot** 62 (8): 2875-2887
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I (1950) The water culture method of growing plants without soil. Berkeley, **University of California**, 32p
- Hodges DM, Delong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta** 207: 604-611

- Horton P and Ruban A (2005) Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. **J Exp Bot** 56 (411): 365-373
- Kopka J, Provarnt NJ, Müller-Röber B (1997) Potato guard cells respond to drying soil by a complex change in the expression of genes related to carbon metabolism and turgor regulation. **Plant J** 11: 871-882
- Lawson T (2009) Guard cell photosynthesis and stomatal function. **New Phytol** 181:13-34
- Lichtenthaler HK, Buschmann C, Knapp M (2005) How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio Rfd of leaves with the PAM fluorometer. **Photosynthetica** 43(3): 379-393.
- Maxwell K, Johnson, GN (2000) Chlorophyll fluorescence-a practical guide. **J Exp Bot** 51: 659-668.
- Munné-Bosch S, Alegre L (2002) Interplay between ascorbic acid and lipophilic antioxidant defences in chloroplasts of water-stressed Arabidopsis plants. **FEBS letters** 524(1-3): 145-148
- Murashige T, Skoog FA (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant** 15: 473-497
- Outlaw Jr WH, Zhang S (2001) Single-cell dissection and microdroplet chemistry. **J Exp Bot** 52: 605-614
- Ortigosa SM, Díaz-Vivancos P, Clemente-Moreno MJ, Pintó-Marijuan M, Fleck I, Veramendi J, Santos M, Hernandez JA, Torné JM (2010) Oxidative stress induced in tobacco leaves by chloroplast over-expression of maize plastidial transglutaminase. **Planta** 232: 593–605

- Oxborough K, Baker NR (1997) An instrument capable of imaging chlorophyll a fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at the cellular and subcellular levels of organization. **Plant Cell Environ** 20: 1473-1483
- Plesch G, Kamann E, Muller-Roeber B (2001) Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. **Plant J** 28(4): 455-464
- Raí AK, Takabe T (2006) Abiotic stress tolerance in plants. Springer, Dordrecht, Netherlands, 254p
- Smirnoff N (1995) Antioxidant systems and plant response to the environment. In: Environment and plant metabolism – flexibility and acclimation. 1 ed. **Scientific Publishers, Oxford**, 217-243
- Talbott LD, Zeiger E (1996) Central roles for potassium and sucrose in guard-cell osmoregulation. **Plant Physiol** 111: 1051–1057
- Tambussi EA, Bartoli CG, Beltrano J, Guiamet JJ, Araus JL (2000) Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). **Physiology Plantarum**, 108: 398-404

CAPÍTULO II

ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE
PLANTAS TRANSGÊNICAS DE *Nicotiana tabacum*
COM ALTERADA CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA
E EFICIÊNCIA DO USO DA ÁGUA

RESUMO

PINHEIRO, Daniela Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2011. **Análise proteômica diferencial de plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* com alterada condutância estomática e eficiência do uso da água.** Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-Orientadores: Werner Camargos Antunes e Thomas Christopher Rhys Williams.

Células-guarda (CG) são altamente especializadas e integram diversos sinais ambientais de forma a otimizar a abertura estomática para o crescimento e para se tolerar determinados estresses ambientais, como a seca. Plantas de tabaco transformadas com vetor contendo construção antisense do gene do transportador de sacarose (P62) sob controle de um promotor específico para células-guarda apresentam menor condutância estomática e maior eficiência do uso da água comparado à planta selvagem (WT), sugerindo que elas podem ser um sistema adequado para identificar proteínas envolvidas na regulação da abertura estomática. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi identificar proteínas diferencialmente expressas em folhas e células-guarda de plantas P62 e WT. As proteínas extraídas de folhas e de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda foram analisadas através de eletroforese bidimensional (2D) em gel de poliacrilamida, com focalização isoelétrica em fita de 24 cm com gradiente linear de pH 3-10 e retiradas do gel para identificação por espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF). A técnica de extração de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda foi eficiente na aquisição de células (CG) viáveis para o estudo proteômico. Entretanto, houve pequenas alterações significativas entre os géis de P62 e WT. CG de plantas P62 apresentaram aumento na expressão de proteínas-chave relacionadas à fixação fotossintética de carbono como a sedoheptulose-1,7-bifosfato fosfatase e a ativase da rubisco, sugerindo uma maior assimilação de CO₂ e atividade do ciclo de Calvin, o que poderia sugerir um mecanismo homeostático de manutenção dos teores de sacarose nestas células. Presença de fotossíntese nas células-guarda pode também ser indiretamente inferida, visto que se identificou outras proteínas fotossintéticas, como a proteína Psad do fotossistema I e algumas subunidades da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco). A análise de proteínas extraídas de folhas revelou que não há diferença significativa entre as plantas WT e P62, consistente com o uso de um promotor específico para células-guarda para dirigir a expressão da

construção antisense. Dessa maneira, a análise proteômica poderá fornecer novas perspectivas para os mecanismos de osmorregulação de células-guarda, além de indicar novos alvos para a manipulação genética, com o objetivo de aumentar a eficiência do uso da água e tolerância ao estresse hídrico.

ABSTRACT

PINHEIRO, Daniela Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2011. **Differential proteomic analysis of transgenic *Nicotiana tabacum* plants exhibiting altered stomatal conductance and water use efficiency.** Adviser: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-Advisers: Werner Camargos Antunes and Thomas Christopher Rhys Williams.

Guard cells (GC) are highly specialized and integrate a variety of environmental signals in order to optimize stomatal aperture both for growth and for tolerance to environmental stresses such as drought. Tobacco plants transformed with an antisense construct targeted against the plasma membrane sucrose transporter gene (P62) expressed under the control of a guard cell specific promoter exhibit lower stomatal conductance and higher water use efficiency compared to wild type plants (WT), suggesting that they may be a suitable system for identifying proteins involved in the regulation of stomatal aperture. Thus, the aim of this study was to identify proteins differentially expressed in leaves and guard cells of P62 and WT plants. Proteins extracted from leaves and guard cell enriched epidermal fragments were analyzed using two-dimensional (2D) poly-acrylamide gel electrophoresis, including a first dimension of isoelectric focusing using a 24-cm strip with a linear gradient of pH 3-10; they were excised from the gel and digested with trypsin for identification by MALDI-TOF-TOF mass spectrometry. The epidermal fragment extraction technique was used to obtain guard cells (GC) for the proteomic study. There were few differences between P62 and WT gels. Comparison of the guard cell proteome, P62 guard cells showed increased expression of key proteins related to photosynthetic carbon fixation, including sedoheptulose-1,7-bisphosphatase and Rubisco activase. This suggests greater assimilation of CO₂ and Calvin cycle activity, what could suggest a homeostatic mechanism to maintain the sucrose level in these cells. Presence of photosynthesis in guard cells could be also supported by the identification of PsaD subunit of photosystem I and some subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco). Analysis of protein extracted from leaves revealed no significant differences between WT and P62 plants, consistent with the use of a guard cell specific promoter to drive expression of the antisense construct. Thus, proteomic analysis should provide further insights into the mechanisms of guard cell osmoregulation and indicate additional targets for

transgenic manipulation with the aim of increasing plant water use efficiency and tolerance to drought stress.

1 INTRODUÇÃO

As proteínas são biomoléculas que exercem papéis fundamentais em quase todos os fenômenos biológicos, como produção de energia, comunicação celular, defesa, dentre outros (Souza *et al.*, 1999). O proteoma de uma célula, tecido ou organismo é composto por milhares de proteínas e apresenta, portanto, uma alta complexidade. A análise proteômica de expressão refere-se à avaliação sistemática desse proteoma, de forma a comparar a expressão protéica de células, tecidos ou organismos em distintos momentos fisiológicos (Wilkins *et al.*, 1995).

A investigação do proteoma de determinados tipos celulares é fundamental para a identificação dos componentes protéicos, além de relacioná-los com a função desempenhada por tais células (Zhu *et al.*, 2009).

As células-guarda são células especializadas, nas quais as respostas aos estímulos podem ocorrer dentro de poucos segundos e, portanto, não são susceptíveis de ser mediada por mudanças no transcriptoma (Zhao *et al.*, 2008). Alteração na expressão gênica envolve processos mais elaborados como, por exemplo, a ativação da transcrição e tradução. Adicionalmente, há diversos processos pós-transcricionais e também pós-traducionais e, por isso, o conjunto de mRNAs expressos num determinado momento pode não refletir o padrão de proteínas naquela mesma célula no mesmo instante analisado. Além disso, o que define as propriedades de uma célula ou organismo não é exclusivamente o DNA ou o RNA e sim, as proteínas codificadas por ele. A proteômica surge, então, como uma ferramenta importante para a caracterização de proteínas expressas em células-guarda num momento específico que pode desta forma, auxiliar na identificação de novos alvos para o estudo dos mecanismos celulares envolvidos na abertura/fechamento estomático.

Estudos envolvendo a análise proteômica de células-guarda são escassos e poucos trabalhos são encontrados na literatura (Zhao *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009), sendo estes realizados com protoplastos de células-guarda. A preparação de protoplastos é um método que utiliza reações enzimáticas para a digestão da parede celular e o processo completo se faz em um período de horas. As respostas encontradas podem ser fruto da resposta ao meio de cultura (digestão) e refletir pouco a resposta ao ambiente. A proposta desse trabalho foi trabalhar com fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda (Kruse *et al.*, 1989). Mediante procedimento já estabelecido em nosso laboratório, é possível a extração de fragmentos epidérmicos em, aproximadamente, 6 a 8 min com alto grau de pureza

(mais de 98%) e com vitalidade das células de interesse (Antunes, 2009). As células mesofílicas ou epidérmicas pavimentosas são praticamente ausentes e pode ocorrer, frequentemente, algum grau de contaminação com tricomas (2 a 3%). A agilidade e rapidez na extração são fundamentais para se alcançar um resultado que retrate, de forma mais real possível, o perfil de proteínas expressas nas células-guarda em um determinado momento em avaliação.

Dentre as ferramentas moleculares utilizadas em proteômica destaca-se a eletroforese bidimensional (2D) associada à espectrometria de massas (MS). Essa técnica permite separar com alta resolução um grande número de proteínas de uma amostra complexa e a possibilidade de se fazer análise da expressão gênica por meio de comparação entre perfis protéicos de diferentes situações fisiológicas. O conjunto das proteínas separadas no gel 2D dá origem a um mapa proteômico, que visa identificar a superexpressão ou a inibição da expressão de proteínas fisiologicamente relevantes nas condições analisadas (Westermeyer, 2001).

Dentro da perspectiva supracitada, a identificação de proteínas diferencialmente expressas em células-guarda de plantas transgênicas com menor condutância estomática pode auxiliar na compreensão molecular dos mecanismos responsáveis pela abertura e/ou fechamento estomático e auxiliar na obtenção de novos alvos para pesquisas relacionadas com o desenvolvimento de plantas mais tolerantes e produtivas em resposta à seca.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal e Condições Experimentais

Plantas de *Nicotiana tabacum* genótipos selvagem (WT- *wild type*) e transgênica P62 L9 (antisense para o gene do Transportador de Sacarose, sob controle do promotor do gene *KST1*) foram cultivadas sob sistema hidropônico em solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950), conforme descrito no item 2.1 e 2.2 do capítulo I.

2.2. Preparação de fragmentos epidérmicos enriquecidos com células-guarda

O protocolo de preparação dos fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda estabelecido por Kruse *et al.* (1989) e Raschke *et al.* (1989) foi testado e ajustado para plantas de tabaco.

Plantas de tabaco controle e transgênicas foram submetidas à extração de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda para posterior extração de proteínas. Para tal extração foi utilizado um liquidificador, no qual se adicionou uma folha grande de tabaco totalmente expandida, sem as nervuras principais e secundárias, acrescentando-se 400 ml de água desionizada. Aplicaram-se pulsos de 15 segundos na velocidade máxima, filtrando-se o extrato em uma membrana de nylon 200 µm. Os fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda ficaram retidos na membrana, possuindo, frequentemente, mais de 98% das células intactas composta por células-guarda (Kopka *et al.*, 1997).

2.3. Extração de Proteínas totais de folha e células-guarda de tabaco

A análise proteômica diferencial de células-guarda de plantas de tabaco manipuladas geneticamente foi realizada com material liofilizado coletado de plantas selvagem e P62 submetidas ao tratamento controle sem PEG-6000.

A extração foi realizada conforme Wang *et al.* (2003). 200 mg de material liofilizado foram pulverizadas com nitrogênio líquido. O tecido pulverizado foi ressuspenso em 20 mL de solução de extração gelada (PMSF 1 mM, PVPP 1%, β-mercaptoetanol 2% em acetona pura), agitando-se vigorosamente e deixado em repouso por 40 min, a -20°C. Após centrifugação a 10.000 g por 15 min a 4°C, o *pellet* foi lavado com 10 mL de acetona gelada por duas vezes. Em seguida, acrescentou-se 10 mL de TCA 10% (m/v) em acetona gelada, agitando-se por 30 s e centrifugando. Este passo foi repetido até o *pellet* ficar “esbranquiçado” (3 a 4 vezes). Repetir o passo de lavagem por duas vezes com TCA 10% em solução aquosa, duas vezes com acetona 80% gelada, seguida por uma lavagem com etanol 80%, deixando o *pellet* secar a temperatura ambiente e, então, armazenou-se em freezer a -20°C *overnight*. Na segunda etapa da extração, 10 mL de tampão SDS-denso (sacarose 30%; SDS 2%; Tris- HCl 0,1 M, pH 8,0; β-mercaptoetanol 2%, PMSF 1 mM) foram adicionados ao tubo contendo o pó da extração obtido na primeira etapa. A mistura foi homogeneizada por 30 segundos e mantida em repouso

por 5 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 6 mL de fenol tamponado pH 8,0 mantendo o tubo no gelo e agitando a cada minuto. A fase fenólica foi separada por centrifugação a 10.000 g por 5 min. A fase superior fenólica foi pipetada e transferida para outros tubos. À fase fenólica foram adicionadas a cinco volumes de acetato de amônio 0,1M em metanol para precipitação das proteínas a -20°C, por 30 min. As proteínas precipitadas foram sedimentadas por centrifugação a 10.000g por 10 min, e lavadas por duas vezes com acetato de amônio 0,1M em metanol, seguida de duas lavagens com acetona 80% e uma com etanol 70%. O precipitado final seco foi dissolvido em tampão de amostra para gel bidimensional (uréia 7M, tiouréia 2 M, CHAPS 2%), e sonificado por três vezes por 1 minuto no gelo. A concentração protéica foi determinada nas amostras de acordo com o método de Bradford (1976) e a pureza e qualidade das amostras foram avaliadas através de gel SDS-PAGE unidimensional.

2.4. Separação das proteínas em géis bidimensionais

No gel bidimensional, a primeira dimensão ou focalização isoeétrica (IEF) foi realizada em fitas de 24 cm com gradientes de anfóteros entre o pH 3-10 (GE Healthcare Upsala, Suécia). Inicialmente, as fitas foram reidratadas por 14-20 h em 450µL de tampão de reidratação (urea 7M; tioureia 2M; CHAPS 2%; azul de bromofenol 0,002%; IPG buffer 2%; DTT 0,2%) contendo 1,0 mg de proteína das amostras. A Focalização Isoelétrica (IEF) foi realizada em um sistema *IPGphor* (GE Healthcare Upsala, Suécia) a 20°C: 10h a 200V; 0,5 kVh a 500 V; 0,8 kVh a 1000 V; 16,5 kVh a 10000 V e 25 kVh a 10000 V. Para a análise da segunda dimensão, as fitas foram equilibradas duas vezes individualmente por 15 min em 5 mL de solução de equilíbrio (urea 6M, glicérol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%, Tris-HCl 50 mM pH 8.8) contendo 1% de DTT e 2,5% de iodoacetamida, respectivamente. A separação da segunda dimensão foi realizada no aparelho *PROTEAN DaltSIX* (GE Healthcare Upsala, Suécia) com espaçadores de 1,0 mm em gel de poliacrilamida 12,5%. As condições da eletroforese foram de 30 min a 20 mA, seguida de 6 h a 40 mA. Para os experimentos de 2D/SDS- PAGE foram utilizadas três réplicas biológicas para confirmar a reprodutibilidade, e permitir a análise estatística das diferenças nas análises densitométricas das imagens.

2.5. Visualização das proteínas em géis bidimensionais, análise de imagem, e quantificação

Para a coloração com azul de *Coomassie* coloidal, os géis foram fixados em solução contendo ácido acético 10% e etanol 40% (overnight). Em seguida, foram lavados com água ultra pura (MilliQ) por 30 segundos, para a remoção da solução de fixação, sendo, então, corados pela adição de azul de *Coomassie* G-250 coloidal a 0,02% por 72 h e mantidos em solução de ácido acético 2% até a digitalização.

As imagens dos géis corados foram digitalizadas utilizando um scanner *ImageScanner II* (GE Healthcare, Upsala, Suécia) e calibradas com o programa *Labscan* (Amersham Biosciences). As análises de imagem foram realizadas no *ImageMaster 2D platinum* (GE Healthcare, Upsala, Suécia). A detecção dos *spots* e comparação entre os géis foram realizadas no programa *ImageMaster 2D platinum* e verificadas e editadas manualmente quando necessário. Nas análises foram considerados *spots* diferencialmente expressos aqueles que apresentaram uma variação na porcentagem de volume entre os tratamentos de 1,5 vezes ou mais (média de três géis), contendo proteínas oriundas de extrações e réplicas biológicas independentes, com diferença estatisticamente significativa segundo ANOVA ($P \leq 0,05$).

2.6. Digestão Triptica

Os *spots* foram manualmente incisados do gel 2D de 24 cm e transferidos para microtubos de 0,2 mL e digeridos com tripsina. A digestão foi realizada segundo protocolo de Shevchenko (2006), onde os pedaços de géis excisados foram descorados em 3 lavagens com solução de acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,8. Após a segunda lavagem, os tubos permaneceram *overnight* sob agitação constante. A acetonitrila foi removida e o gel passou por um passo de desidratação com 200 μL de acetonitrila 100%, seguido por secagem a vácuo por 15 min. Os pedaços de gel foram reduzidos em 100 μL de DTT 65 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min, à temperatura de 56°C. Posteriormente, foram alquilados com 100 μL de iodoacetamida 200 mM, por 30 min a temperatura ambiente, lavados com solução de bicarbonato de amônio 100 mM e desidratados com 200 μL de acetonitrila 100% por 5 min. Então, adicionou-se 20 μL de uma solução de tripsina 25 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ por 45 min no gelo para que a enzima penetrasse no

gel sem que se iniciasse a digestão. Em seguida, foi acrescentado 50 μL de solução de bicarbonato de amônio 40 mM em acetonitrila 10% e mantido a 37°C *overnight*. As amostras constituídas de peptídeos oriundos da digestão trípica foram o purificadas e desalinizadas utilizando-se ponteiras de 0,6 μL ZipTip[®] com resina C18 (Millipore) segundo o protocolo do fabricante.

2.7. Análise por espectrometria de massa e identificação de proteínas

As amostras foram aplicadas em placa de MALDI na proporção 1:1 de amostra e matriz (ácido α -ciano-4-hidrocinâmico) em 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético. Os fragmentos resultantes da digestão trípica foram analisados no intervalo de 500-3500 Da no instrumento ULTRAFLEX III MALDI-TOF-TOF (BRUKER Daltonics). Os peptídeos foram identificados usando o método de *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF - MS1) e a fragmentação dos peptídeos trípicos (MS/MS) foi realizada para os cinco picos mais intensos. Os espectros MS1 e MS/MS gerados foram confrontados contra o banco de dados NCBI-Nr (*National Center for Biotechnology Information- Non redundant*) contidos no programa *Mascot* (Matrix Science, Londres, Inglaterra), sendo que proteínas com espectros com valor do índice iônico (ion score) menor que 40 foram considerados com identificação não validados ou abaixo do nível de confiabilidade, e então não considerados como proteínas identificadas. Além disso, foi feita a comparação de ponto isoelétrico e massa molecular teórico com aqueles encontrados no gel.

3 RESULTADOS

3.1. Extração de Proteínas

As análises do proteoma diferencial foram feitas em folhas e fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda das plantas cultivadas em sistema hidropônico sob condições controle (solução nutritiva de Hoagland). A extração de proteínas foi feita a partir do material congelado e liofilizado (Fig.1).

Tabela 1: Concentração de proteínas totais das extrações de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda e folha de plantas de *Nicotiana tabacum* selvagem (WT) e transgênica antisenso para o transportador de sacarose (P62 L9).

	Frag. Epidérmico enriquecido em células-guarda ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ MS)	Folha ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ MS)
WT - 1	6,6	171,0
WT - 2	6,9	157,4
WT - 3	6,1	191,6
P62 L9 - 1	14,6	211,5
P62 L9 - 2	11,6	140,9
P62 L9 - 3	12,3	156,2

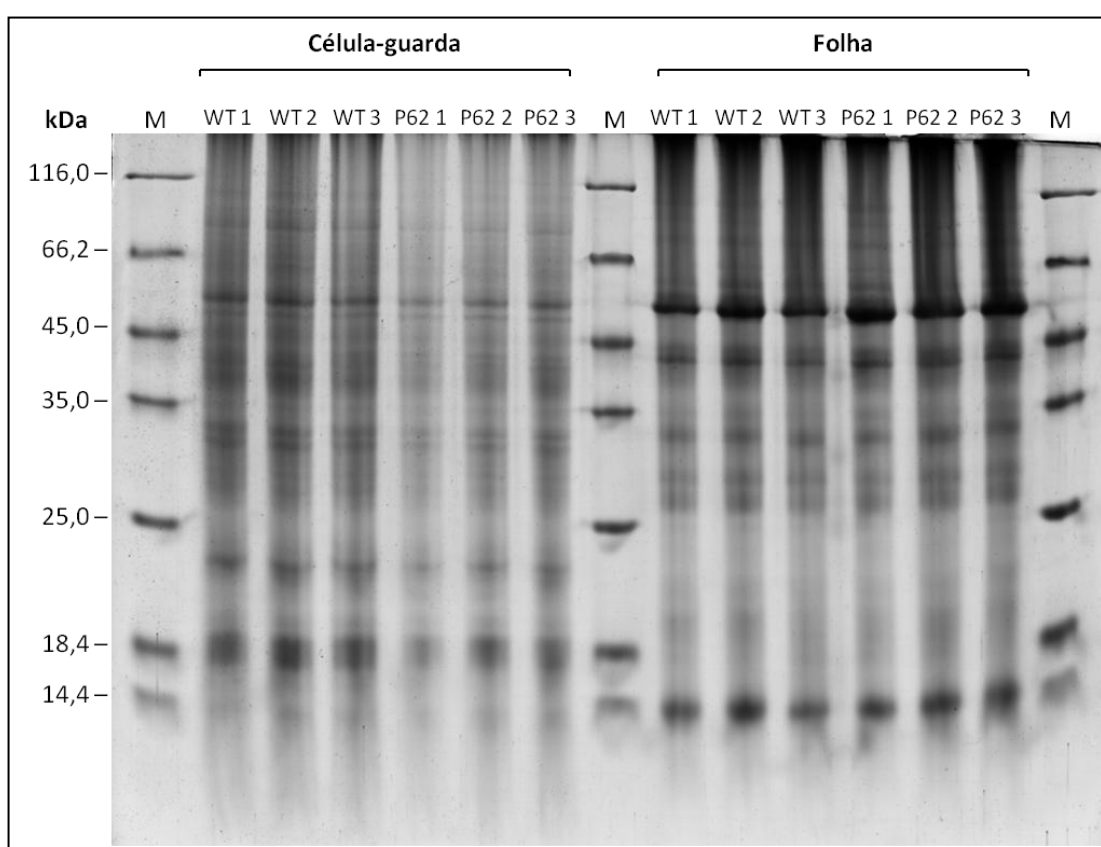


Figura 1: Avaliação de extração de proteínas de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda e folha de plantas de tabaco do tipo selvagem (WT) e transgênica (P62 L9). M – marcador de peso molecular. Em cada poço foram aplicadas 50 μg de proteína total em gel SDS-PAGE a 12,5% que foi corado com *Comassie* coloidal.

A eficiência da extração de proteínas em folhas é superior à de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda (Tab. 1). Além disso, é possível visualizar perfis de expressão protéicos bem distintos entre tecido foliar e células-guarda (Fig. 1).

3.2. Análise do proteoma diferencial de folhas em plantas de tabaco selvagem e transgênica

As análises dos géis bidimensionais referentes às amostras protéicas de folha mostraram grande reprodutibilidade dos resultados, havendo grandes semelhanças entre os géis de um mesmo genótipo (Fig. 2).

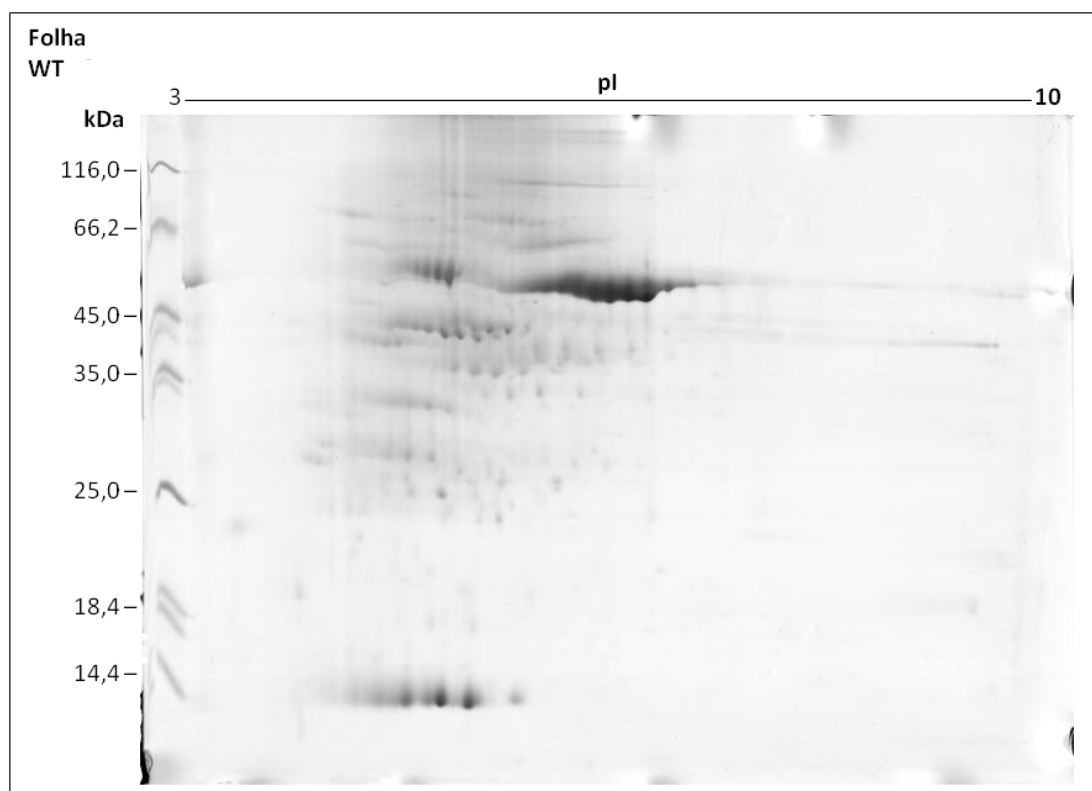


Figura 2: Gel bidimensional de proteínas de folha de *N. tabacum*, genótipo selvagem (WT) corado com *Coomassie* coloidal. pI: ponto isoelétrico.

Nos géis referentes à planta selvagem (WT) foi detectado um total de 348 *spots*, enquanto 340 *spots* foram detectados nos de plantas transgênicas (P62 L9). A contagem dos *spots* foi feita a partir da análise de *match* feita pelo software *Image Master* entre os géis.

A análise proteômica em folhas revelou que não há diferença significativa entre plantas WT e P62 L9. É importante ressaltar que este resultado é referente às proteínas abundantes detectáveis pelo método de eletroforese bidimensional cuja coloração é feita com *Coomassie* coloidal.

3.3. Análise do proteoma diferencial de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda em plantas de tabaco selvagem e transgênica

Géis 2D de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda apresentaram maior distribuição dos *spots* ao longo de toda a faixa de pH comparado aos géis de tecido foliar.

A partir das análises feitas com o software *Image Master* foi possível detectar um total de 624 *spots* nos géis da planta selvagem e 648 nos de P62. Entretanto, houve pequenas alterações significativas ($P < 0,05$) entre os géis de P62 e WT. Apenas oito *spots* foram classificados como diferencialmente expressos, sendo retirados do gel para identificação por espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF). Desses, quatro *spots* foram detectados apenas em P62, três em WT e houve redução de 44,2% na expressão de um *spot* em P62 com relação à planta selvagem (Tab. 2).

Nas Figuras 3 e 4 estão representados os *spots* que apresentaram abundância diferencial em células-guarda (CG) do genótipo tipo selvagem (WT) e transgênica (P62 L9) que foram retirados para análise por espectrometria de massa.

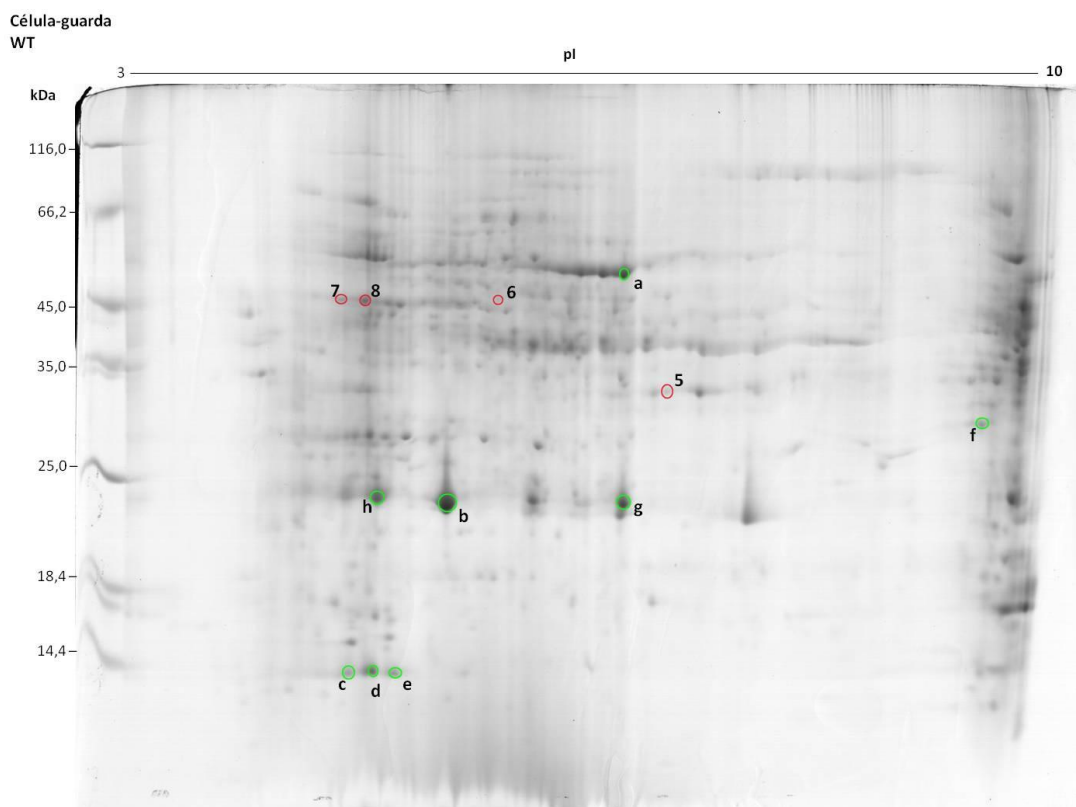


Figura 3: Gel bidimensional de proteínas de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda de plantas de *N. tabacum* não-transformadas. Os *spots* com expressão diferencial entre os genótipos estão representados em vermelho. Os *spots* em verde representam proteínas abundantes em ambos os genótipos. As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 3-10, posteriormente separadas por 2D/SDS-PAGE e coradas com *Coomassie* coloidal.

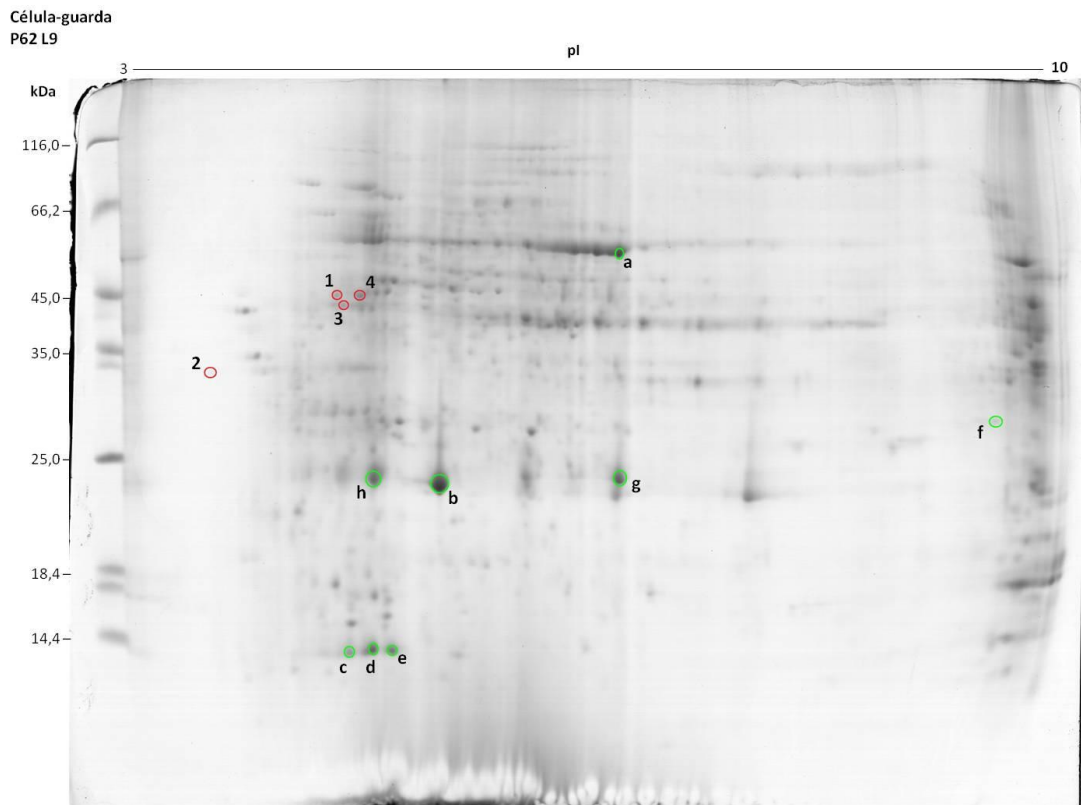


Figura 4: Gel bidimensional de proteínas de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda de plantas transgênicas. Os *spots* com expressão diferencial entre os genótipos estão representados em vermelho. Os *spots* em verde representam proteínas abundantes em ambos os genótipos. As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 3-10, posteriormente separadas por 2D/SDS-PAGE e coradas com *Coomassie* coloidal. A expressão diferencial foi analisada no software *ImageMaster 2D Platinum* ($P < 0,05$).

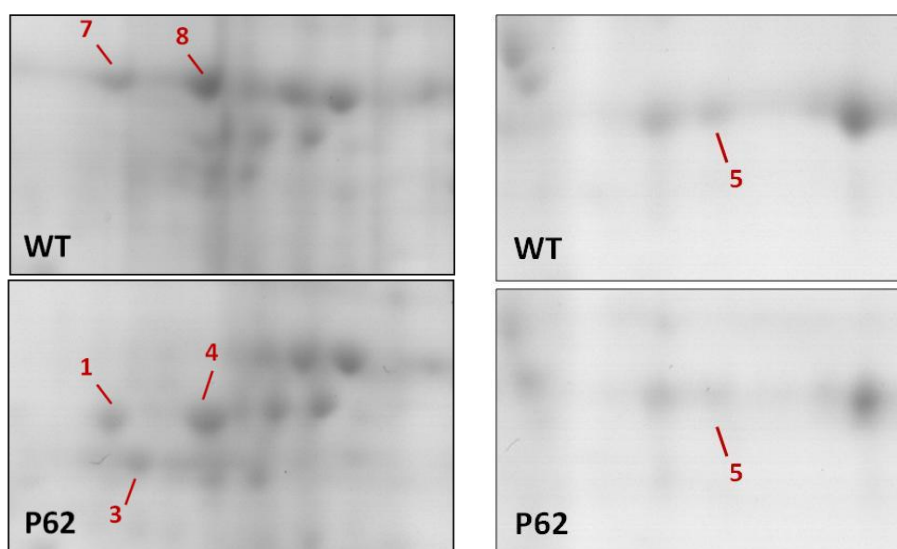


Figura 5: Ampliação de regiões de interesse dos géis de WT e P62.

Tabela 2: Média da abundância relativa (% volume) das proteínas diferencialmente expressas ($P < 0,05$) em fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda de plantas de *Nicotiana tabacum* selvagem (WT) e transgênica antisense para o transportador de sacarose (P62 L9).

Spot ID	Match ID	%Vol		%
		WT	P62 L9	
1	402	0,000 ± 0,000	0,323 ± 0,046	Presente em P62
2	964	0,000 ± 0,000	0,058 ± 0,005	Presente em P62
3	1002	0,000 ± 0,000	0,228 ± 0,042	Presente em P62
4	1008	0,000 ± 0,000	0,407 ± 0,071	Presente em P62
5	1201	0,169 ± 0,015	0,094 ± 0,033	Redução de 44,2% em P62
6	1227	0,044 ± 0,007	0,000 ± 0,000	Presente em WT
7	1229	0,491 ± 0,071	0,000 ± 0,000	Presente em WT
8	1230	0,783 ± 0,229	0,000 ± 0,000	Presente em WT

Spot ID - identificação do *spot*; Match ID - identificação do *match*. Os valores representam as médias da percentagem em volume (abundância relativa) ± o desvio padrão de três réplicas biológicas. As médias diferem entre si segundo teste T student ($p < 0,05$).

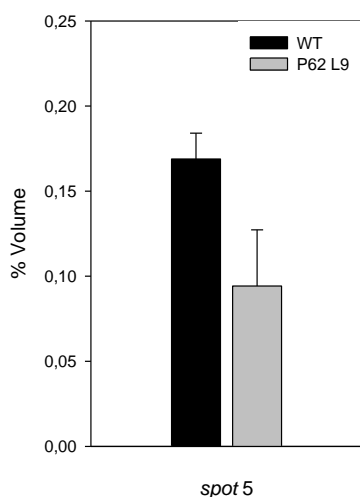


Figura 6: Porcentagem de Volume do *spot* 5.

Após a excisão dos géis, os *spots* diferencialmente expressos foram submetidos à tripsinização e dessalinização para posterior identificação por *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF - MS1). Entretanto, não foi possível identificar nenhuma das oito proteínas em questão com escore adequado de certidão (MO - pontuação MOWSE fornecido pelo MASCOT). Para obter dados adicionais para ajudar a identificação dessas proteínas, alguns picos do espectro MS1 foram selecionados para o seqüenciamento (MS/MS).

Tabela 3: Identificação por espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF) de proteínas expressas em fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda de plantas de *Nicotiana tabacum* selvagem (WT) e transgênica antisense para o transportador de sacarose (P62 L9).

<i>Spot ID</i>	Gel	Identificação da Proteína	Organismo	MS1	MS/MS	pI/MM (Da) Teórico
1	P62	-	-	-	-	-
2	P62	-	-	-	-	-
3	P62	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	x	6,07/43.017
		Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	<i>Spinacia oleracea</i>	-	x	5,87/42.568
4	P62	Ativase da Rubisco 1	<i>Nicotiana tabacum</i>	-	x	8,44/48.951
		Ativase da Rubisco 2	<i>Nicotiana tabacum</i>	-	x	8,14/48.541
		Ativase da Rubisco 2	<i>Nicotiana tabacum</i>	-	x	8,14/48.541
5	↓ 44,2% em P62	-	-	-	-	-
6	WT	Putative alpha-galactosidase	<i>Oryza sativa</i>	-	x	5,47/45.150
		Alpha-galactosidase 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	x	6,19/46.079
7	WT	-	-	-	-	-
8	WT	-	-	-	-	-

Spot ID - identificação do *spot*; MS1 - identificação de proteína por *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF); MS/MS - Fragmentação de peptídeos; pI/MM (Da) - ponto isoelétrico/massa molecular em daltons; verde – *spots* encontrados apenas nos géis da planta genótipo P62; azul – *spots* encontrados nos géis da planta selvagem; vermelho – *spots* encontrados em ambos genótipos.

A partir da análise dos espectros obtidos pelo seqüenciamento dos peptídeos, foi possível identificar três das oito proteínas diferencialmente expressas em células-guarda (Tab. 3 e 4). As proteínas Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase e Ativase da Rubisco foram identificadas como proteínas expressas somente em CG de plantas transgênicas, não sendo detectada a presença das mesmas na planta controle. Em contrapartida, a enzima alpha-galactosidase foi identificada somente em plantas selvagem.

Tabela 4: Identificação por espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF) de proteínas expressas em fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda de plantas de *Nicotiana tabacum* selvagem (WT) e transgênica antisense para o transportador de sacarose (P62 L9) através do *MASCOT MS/MS Ion search*.

Análise do MS/MS

<i>Spot ID</i>	Peptídeo	Sequência	Identificação da Proteína	MO	FM	E-value	SC (%)	Banco de Dados	Número de Acesso	Organismo
3	1188,5	FEETLYGSSR	chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	41	19	3,4E-02	2%	NCBIInr	gi 238563983	<i>S. lycopersicum</i>
	1348,6	DQVAAAMGIYGPR	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplastic	53	17	3,5E-03	3%	NCBIInr	gi 3914940	<i>S. oleracea</i>
4	1185,6	SFQCELVFR	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 1	40	11	3,9E-03	2%	Swiss-Prot	RCA1_TOBAC	<i>N. tabacum</i>
			Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 2	40	11	3,9E-03	2%	Swiss-Prot	RCA2_TOBAC	<i>N. tabacum</i>
	1882,9	IVDTFPGQSIDFFGALR	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 2	61	9	2,5E-05	3%	Swiss-Prot	RCA2_TOBAC	<i>N. tabacum</i>
6	1665,7	YVNIDDCWAEPQR	Putative alpha-galactosidase	81	15	4,3E-06	3%	NCBIInr	gi 10140702	<i>O. sativa</i>
	1779,8	MEGDLEWVWAGPLSGYR	Alpha-galactosidase 1	44	19	1,9E-02	3%	NCBIInr	gi 15241601	<i>A. thaliana</i>

Spot ID - identificação do *spot*; MO - pontuação MOWSE (score); FM - número de fragmentos (íons) que deram *match*; SC (%) - percentual de cobertura da sequência. A proteína com melhor correspondência no banco de dados foi classificada com a espécie em que foi identificada e com seu número de acesso.

3.4. Análise de algumas proteínas abundantes do proteoma de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda

Estudos envolvendo proteoma de células-guarda são muito escassos. Diante disso, foram selecionados oito *spots* presente em todos os genótipos que não apresentaram expressão diferencial entre os tratamentos (Fig. 3 e 4).

A partir da análise dos perfis de *Peptide Mass Fingerprinting* para as oito proteínas foi possível identificar quatro proteínas (Tab. 5 e 6A), a subunidade maior e duas subunidades menores da Rubisco e a subunidade II do centro de reação do Fotossistema I. As três subunidades da Rubisco foram confirmadas por MS/MS (Tab. 6B).

Tabela 5: Identificação por espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF) de proteínas abundantes expressas em fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda de plantas de *Nicotiana tabacum*.

<i>Spot ID</i>	<i>Match ID</i>	Identificação da Proteína	Organismo	pI/MM (Da) Teórico	pI/MM (Da) estimado pelo gel
a	469	Subunidade maior da RUBISCO	<i>N. tabacum</i>	6,41/53.378	6,76/52.317
b	261	Germin like protein	<i>N. tabacum</i>	5,84/21.522	5,43/23.107
c	190	Subunidade menor da RUBISCO	<i>N. tabacum</i>	4,99/14.661	4,72/13.476
d	192	Subunidade menor da RUBISCO	<i>N. tabacum</i>	4,99/14.661	4,90/13.561
e	917	Subunidade menor da RUBISCO	<i>N. tabacum</i>	4,99/14.661	5,06/13.630
f	1194	Photosystem I reaction center subunit II	<i>S. lycopersicum</i>	9,71/22.961	9,47/28.447
g	260	24K germin like protein	<i>N. tabacum</i>	5,82/22.125	6,77/23.771
h	264	Germin like protein	<i>N. tabacum</i>	5,84/21.522	4,91/23.495

Spot ID - identificação do *spot*; *Match ID* - identificação do *match*; MS1 - identificação de proteína por *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF); MS/MS - Fragmentação de peptídeos; pI/MM (Da) - ponto isoelétrico/massa molecular em daltons.

As quatro proteínas restantes foram identificadas pelo sequenciamento de peptídeos selecionados a partir dos espectros de MS1 (Tab. 5 e 6B). Três *spots* representam três tipos de *germin like protein* e o outro é uma subunidade menor da Rubisco.

Tabela 6: Identificação por espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF) de proteínas abundantes expressas em fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda de plantas de *Nicotiana tabacum* selvagem (WT) e transgênica (P62 L9).

A) Análise do MS1

Spot ID	Identificação da Proteína	MO	PM	E-value	SC (%)	pI/MM (Da) Teórico	Banco de dados	Organismo
a	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	170	17	2,8E-13	44%	6,41/53.378	Swiss-Prot	N. tabacum
b	-	-	-	-	-	-	-	-
c	putative ribulose bisphosphate carboxylase small subunit	112	8	4,4E-06	35%	7,57/20.496	NCBIInr	N. tabacum
d	Carboxylase/oxygenase,RBP	110	9	7,0E-06	68%	4,99/14.661	NCBIInr	N. tabacum
e	-	-	-	-	-	-	-	-
f	Photosystem I reaction center subunit II	71	9	0,0021	46%	9,71/22961	Swiss-Prot	S. lycopersicum
g	-	-	-	-	-	-	-	-
h	-	-	-	-	-	-	-	-

B) Análise do MS/MS

Spot ID	Peptídeos	Sequência	Identificação da Proteína	MO	FM	E-value	SC (%)	Banco de Dados	Número de Acesso	Organismo
a	1170,6	DPGLLLHIHR	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase	59	20	2,30E-03	2%	NCBIInr	gi 552986	<i>Z. gramineum</i>
	1187,7	DNGLLLHIHR	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	59	20	2,30E-03	2%	NCBIInr	gi 11465965	<i>N. tabacum</i>
	1465,7	TFQGPPHGIQVER	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	95	23	7,00E-07	2%	NCBIInr	gi 11465965	<i>N. tabacum</i>
	2170,0	GGLDFTKDDENVNSQPFR	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	120	29	1,40E-09	3%	NCBIInr	gi 11465965	<i>N. tabacum</i>
b	1550,9	LVEATTLDEATIK	germin like protein	101	19	3,00E-08	6%	NCBIInr	gi 222051768	<i>N. tabacum</i>
	1678,8	LVEATTLDEATIKK	germin like protein	100	19	9,30E-08	7%	NCBIInr	gi 222051768	<i>N. tabacum</i>
c	1802	QVQCISFIAAYKPEGY	putative ribulose bisphosphate carboxylase small subunit protein precursor	99	26	6,40E-08	8%	NCBIInr	gi 30013663	<i>N. tabacum</i>

Tabela 6 (continuação)

<i>Spot ID</i>	Peptídeos	Sequência	Identificação da Proteína	MO	FM	E-value	SC (%)	Banco de Dados	Número de Acesso	Organismo
d	1005,5	AYPEAWIR	carboxylase/oxygenase,RBP	45	19	4,70E-02	6%	NCBIInr	gi 223593	<i>N. tabacum</i>
	1785,8	QVQCISFIAYKPEGY	Ribulose biphosphate carboxylase small chain	51	15	3,10E-04	8%	Swiss-Prot	RBS_TOBAC	<i>N. tabacum</i>
	1802,8	QVQCISFIAYKPEGY	putative ribulose biphosphate carboxylase small subunit protein precursor	86	23	1,50E-06	8%	NCBIInr	gi 30013663	<i>N. tabacum</i>
			carboxylase/oxygenase,RBP	86	23	1,50E-06	12%	NCBIInr	gi 223593	<i>N. tabacum</i>
e	1133,6	KAYPQAWIR	Full=Ribulose biphosphate carboxylase small chain	51	24	8,70E-03	5%	NCBIInr	gi 59800169	<i>N. tabacum</i>
	1785,8	QVQCISFIAYKPEGY	putative ribulose biphosphate carboxylase small subunit protein precursor	71	18	7,20E-05	8%	NCBIInr	gi 30013663	<i>N. tabacum</i>
	1802,9	QVQCISFIAYKPEGY	carboxylase/oxygenase,RBP	114	25	4,00E-09	12%	NCBIInr	gi 223593	<i>N. tabacum</i>
			putative ribulose biphosphate carboxylase small subunit protein precursor	114	25	4,00E-09	8%	NCBIInr	gi 30013663	<i>N. tabacum</i>
f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
g	2049,1	KPSAVTANDFVFSGLATPVK	24K germin like protein	163	43	2,20E-14	9%	NCBIInr	gi 31711507	<i>N. tabacum</i>
h	1550,8	LVEATTFLDEATIK	germin like protein	129	23	1,10E-10	6%	NCBIInr	gi 222051768	<i>N. tabacum</i>
	1678,9	LVEATTFLDEATIKK	germin like protein	93	21	3,10E-07	7%	NCBIInr	gi 222051769	<i>N. tabacum</i>

Spot ID - identificação do *spot*; *Match ID* - identificação do *match*; MS1 - identificação de proteína por *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF); MS/MS - Fragmentação de peptídeos; pI/MM (Da) - ponto isoelétrico/massa molecular em daltons; MO - pontuação MOWSE(score); PM - número de peptídeos que deram *match* ; FM - número de fragmentos (íons) que deram *match*; SC (%) - percentual de cobertura da sequência.

4 DISCUSSÃO

4.1. Extração de Proteínas

A folha é um órgão especializado para a realização da fotossíntese, sendo o tecido mesofílico o componente mais abundante e responsável pela captação de luz e assimilação de CO₂. Nesse contexto, células-guarda são menores e compreendem uma pequena fração das células totais da folha (Zhu *et al.*, 2009).

Os fragmentos epidérmicos enriquecido em células-guarda possuem mais de 98% das células intactas composta por células-guarda (Kopka *et al.*, 1997; Antunes, 2009). Além disso, as células mesofílicas ou epidérmicas pavimentosas são praticamente ausentes, restando somente a parede celular das células epidérmicas ao redor das células-guarda. Devido a esse fato, a mesma quantidade de matéria seca de tecido foliar possui maior concentração de células viáveis para a extração de proteínas e, com isso, o rendimento da extração foi superior a de fragmentos epidérmicos (Tab. 1).

A partir da imagem do gel unidimensional das amostras de folha e de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda é possível visualizar perfis de expressão protéicos bem distintos (Fig. 1). Zhu *et al.* (2009) reportaram diferenças expressivas entre o proteoma de células-guarda e células mesofílicas. Dentro dessa perspectiva, proteínas envolvidas na produção de energia (respiração), transporte, transcrição, estrutura celular e sinalização são preferencialmente expressas em células-guarda, enquanto células mesofílicas apresentaram maior expressão de proteínas envolvidas em fotossíntese, síntese de amido, metabolismo e relacionadas à defesa, doenças e estresses (Zhu *et al.*, 2009).

4.2. Proteoma diferencial de folhas em plantas de tabaco selvagem e transgênica

A sacarose é a principal forma de carboidrato solúvel transportado pelo floema. Por isso, uma das principais funções dos transportadores de sacarose está relacionada ao carregamento e descarregamento do floema (Liesche *et al.*, 2011). Dada a importância da proteína transportadora de sacarose para o desenvolvimento da planta, vale ressaltar a importância da utilização de promotores específicos para o estudo direcionado da função gênica deste transportador em CG, evitando, pois, efeitos pleiotrópicos decorrentes da utilização de promotores não específicos.

A partir dos dados da análise proteômica de folha, verificou-se que a inserção da construção antisense para o transportador de sacarose dirigida pelo promotor do gene *KST1* (canal de potássio) no genoma da planta não alterou o perfil protéico do tecido foliar das plantas P62 L9. Este resultado evidencia que o fenótipo dessas plantas pode estar diretamente ligado a modificações exclusivamente em células-guarda.

Contudo, este resultado se limita às proteínas mais abundantes, detectáveis pelo método de coloração com *Coomassie* coloidal, cujo limite de detecção é de aproximadamente, 10 ng de proteína por *spot* (Lin *et al.*, 2008). Assim, não é possível detectar proteínas com um pequeno número de cópias dentro da célula, como por exemplo, as proteínas sinalizadoras.

O atual trabalho visou detectar os efeitos causados pela inserção da construção antisense do transportador de sacarose dirigido pelo promotor do gene *KST1* no proteoma de folhas e de células-guarda separadamente, por isso não foi realizada a comparação entre eles.

4.3. Proteoma diferencial de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda em plantas de tabaco selvagem e transgênica

Células-guarda (CG) são células altamente especializadas, cujas mudanças de pressão de turgor e volume controlam os movimentos estomáticos. As respostas das CG aos estímulos podem ocorrer dentro de segundos e, assim, não podem ser mediadas por mudanças no transcriptoma (Zhao *et al.*, 2008). A identificação de proteínas diferencialmente expressas em plantas transgênicas (P62 L9) e plantas não-transformada pode auxiliar na compreensão dos mecanismos de abertura/fechamento estomático.

A enzima sedoheptulose-1,7-bifosfato fosfatase (SBPase) foi identificada como presente em plantas P62 e ausente em WT. A SBPase catalisa a desfosforilação da molécula de sedoheptulose-1,7-bifosfato. É uma das enzimas-chave do Ciclo de Calvin, agindo no ponto de ramificação entre a regeneração da ribulose-1,5-bifosfato e a síntese de amido (Lefebvre *et al.*, 2005). Estudos com plantas transgênicas de tabaco com aumento na atividade de SBPase evidenciaram um aumento na fotossíntese e no crescimento (Miyagawa *et al.*, 2001; Lefebvre *et al.*, 2005), e este

aumento pode ser atribuído a um aumento na capacidade regenerativa da ribulose-1,5-bifosfato.

O menor conteúdo de sacarose em células-guarda de plantas P62 foi associado com menor condutância estomática (g_s), evidenciando a importância do transporte de sacarose do apoplasto para o simplasto das CG como forma de otimizar a abertura estomática (Antunes, 2009). O aumento da expressão de SBPase sugere uma maior atividade do Ciclo de Calvin nos cloroplastos de CG das plantas transgênicas, aumentando a fixação fotossintética de CO_2 , a fim de compensar a baixa importação de sacarose do apoplasto.

A identificação de maior presença da ativase da Rubisco (*spot 4*) em plantas transgênicas, assim como da SBPase, suporta a hipótese de que há maior fixação fotossintética de carbono nos cloroplastos de células-guarda de plantas P62. A ativase da Rubisco age de tal forma a promover e manter a rubisco em sua conformação ativa por remover metabólitos inibidores (Portis, 1995; Portis 2003).

A α -galactosidase é uma enzima encontrada frequentemente associada a parede celular das plantas. Como se extraiu fragmentos epidérmicos, contendo uma parte da parede celular das células epidérmicas da folha é possível que isso tenha enriquecido a amostra com proteínas extracelulares, como esta enzima. Mutantes para esta enzima apresentam drásticas alterações na morfologia foliar, indicando uma importante função das mesmas no desenvolvimento foliar.

Não foi possível, neste trabalho, identificar as outras quatro proteínas diferencialmente expressas. O *spot 2* é expresso somente em P62. É interessante ressaltar que esse *spot* representa uma proteína de baixo pI (3,66, estimativa via gel bidimensional), faixa de pH na qual se observa poucas proteínas expressas. No que concerne ao *spot 5*, sua expressão reduziu 44,2% em plantas transgênicas (Fig. 6), porém não foi possível a sua identificação por espectrometria de massas até o momento. Será necessária a confecção de vários géis, de forma a obter maior quantidade da proteína de forma a obter uma sequência da mesma.

4.4. Proteínas abundantes em fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda

A identificação de proteínas expressas em determinados tipos celulares é de grande importância, pois oferece uma determinação mais acurada dos componentes protéicos e sua relação com a função desempenhada por tal célula (Zhu *et al.*, 2009). O estudo do proteoma de células-guarda pode ser utilizado para melhor compreender os mecanismos que controlam a abertura estomática e, assim, aumentar o conhecimento de como as plantas interagem com as mudanças relacionadas ao ambiente em que vivem.

A análise de oito *spots* abundantes do proteoma de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda revelou que cinco dessas proteínas estão relacionadas com o processo fotossintético. As células-guarda são as únicas células localizadas na epiderme foliar que possui cloroplastos, contudo a função dessas organelas nas respostas estomáticas ainda é tema de muitos debates (Lawson, 2009).

A atividade da enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) em células-guarda é baixa comparada às células mesofílicas (Wang e Song, 2008), porém foi possível identificar maiores teores de uma subunidade maior e três subunidades menores da Rubisco nos géis bidimensionais (Tab. 5 e 6; Fig. 3 e 4). É interessante ressaltar que a abertura induzida por luz e o fechamento mediado por C_i (concentração interna de CO_2) do poro estomático não depende da capacidade fotossintética de células-guarda ou mesofílicas. Usando plantas transgênicas de tabaco com conteúdo reduzido de Rubisco, Von Caemmerer *et al.* (2004) mostrou que, apesar das reduções similares na capacidade fotossintética de CG e células mesofílicas, a resposta estomática frente a um aumento de luz e mudanças de C_i foram similares às plantas selvagens.

A subunidade II do centro de reação do fotossistema I (PSI), identificada como uma proteína abundante, também é comumente chamada de PsaD. O fotossistema I é um grande complexo protéico encontrado nas membranas dos tilacóides e está envolvido na captação de luz e produção de NADPH. A pequena subunidade PsaD (~20 kDa) é encontrada no lado estromal do complexo do PSI e está envolvida na ancoragem tanto da proteína ferredoxina quanto da ferredoxina-NADP redutase (Fromme, 2001) e, portanto, é essencial para a transferência de elétrons e redução da molécula de $NADP^+$. O nível do fluxo de elétrons, fotofosforilação, em cloroplastos de células-guarda tem sido relatado por ser tão alto

como em células mesofílicas (Shimazaki & Zeiger, 1985; Lawson *et al.*, 2002) e a produção de ATP e poder redutor poderiam ser utilizados em outros processos além da fixação de CO₂, como por exemplo, na osmorregulação em CG.

As *Germin-like-proteins* (GLP) identificadas como proteínas abundantes em fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda (Tab. 5 e 6; Fig. 3 e 4) representam membros de uma “superfamília” de proteínas. As GLPs em plantas possuem uma diversidade de funções bioquímicas, e parecem estar envolvidas em vários processos importantes incluindo desenvolvimento, regulação osmótica, oscilação do fotoperíodo, resistência a patógenos e apoptose. As GLPs de monocotiledôneas aparentam ter uma atividade de oxalato oxidase, que degrada oxalato em CO₂ e H₂O₂, enquanto as de dicotiledôneas não possuem esta atividade (Lu, 2010). Rodríguez-López e colaboradores (2001) identificaram duas isoformas de *germin-like protein* de folhas de *Hordeum vulgare* com atividade de pirofosfatase/fosfodiesterase que hidrolisa alguns compostos de baixo peso molecular com ligações fosfodiésteres, tais como nucleotídeos-açúcares. Diante dessa imensa diversificação de funções, torna-se difícil a inferência da real importância dessas proteínas para as células-guarda. No entanto, abre caminhos para novos estudos com o intuito de revelar qual o possível papel de GLPs para o metabolismo e funcionamento das células-guarda.

5 CONCLUSÃO

O maior desafio para proteômica em células-guarda é a obtenção de células em quantidades suficientes para a extração de proteínas. A técnica de extração de fragmentos epidérmicos enriquecidos em células-guarda foi eficiente na aquisição de células (CG) viáveis para o estudo proteômico.

A inserção da construção antisense para o transportador de sacarose dirigido pelo promotor do gene *KST1* específico para células-guarda em plantas de *Nicotiana tabacum* foi eficiente em não alterar o perfil proteômico em folhas. No entanto, pode-se sugerir que o menor teor de sacarose em células-guarda induziu a um aumento na expressão de proteínas-chave relacionadas à fixação fotossintética de carbono como a sedoheptulose-1,7-bisfosfatase e a ativase da rubisco, sugerindo uma maior assimilação de CO₂ e atividade do ciclo de Calvin a fim de se manter os níveis de sacarose necessários aos diversos processos, como por exemplo, a osmorregulação.

A atividade fotossintética é suportada pela presença de proteínas envolvidas tanto no processo fotoquímico, como a subunidade PsaD do fotossistema I, quanto a própria enzima de carboxilação, a ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) encontradas no conjunto de proteínas expressas em células-guarda.

Estudos relacionados ao proteoma de células-guarda são de grande importância para a compreensão dos mecanismos responsáveis pela regulação estomática. Além disso, a interconexão do proteoma de plantas selvagens e transgênicas com alterações no conteúdo de sacarose pode fornecer novas evidências sobre os mecanismos de osmorregulação das células-guarda e indicar alvos adicionais para a manipulação transgênica, com o objetivo de aumentar a eficiência do uso da água e tolerância ao estresse hídrico.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antunes WC (2009) Engineering for desiccation postponement: antisense of sucrose transporter in tobacco specifically on guard cells results in reduced stomatal conductance and increased water use efficiency. Viçosa, UFV. 75 p (**Tese de Doutorado**)

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal Biochem** 72: 248–54

Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. The water culture method of growing plants without soil. Berkeley, **University of California**, 1950. 32p

Kopka J, Provar NJ, Müller-Röber B (1997) Potato guard cells respond to drying soil by a complex change in the expression of genes related to carbon metabolism and turgor regulation. **Plant J** 11: 871-882

- Kruse T, Tallman G, Zeiger E (1989) Isolation of guard cell protoplasts from mechanically prepared epidermis of *Vicia faba* leaves. **Plant Physiol** 90: 1382-1386
- Lawson T, Oxborough K, Morison JIL, Baker NR (2002) Responses of photosynthetic electron transport in stomatal guard cells and mesophyll cells in intact leaves to light, CO₂, and humidity. **Plant Physiol** 128: 52-62
- Lawson T (2009) Guard cell photosynthesis and stomatal function. **New Phytol** 181:13-34
- Lefebvre S, Lawson T, Fryer M, Zakhleniuk OV, Lloyd JC, Raines CA (2005) Increased Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase Activity in Transgenic Tobacco Plants Stimulates Photosynthesis and Growth from an Early Stage in Development. **Plant Physiol** 138: 451–460
- Liesche J, Krügel U, He H, Chincinska I, Hackel A, Kühn C (2011) Sucrose transporter regulation at the transcriptional, post-transcriptional and post-translational level. **J Plant Physiol.** 26: [Epub ahead of print]
- Lin J, Chen Q, Tian H, Gao X, Yu M, Xu G, Zhao F (2008) Stain efficiency and MALDI-TOF MS compatibility of seven visible staining procedures. **Anal Bioanal Chem** 390:1765–1773
- Lu M, Han Y-P, Gao J-G, Wang X-J, Li W-B (2010) Identification and analysis of the germin-like gene family in soybean. **BMC Genomics** 11: 620
- Miyagawa Y, Tamoi M, Shigeoka S (2001) Overexpression of a cyanobacterial fructose-1,6-sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in tobacco enhances photosynthesis and growth. **Nat Biotechnol** 19: 965–969
- Pandey A, Mann M (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405: 837- 846

- Portis AR (1995) The regulation of Rubisco by rubisco activase. **J Exp Bot** 46: 1285–1291.
- Portis AR (2003) Rubisco activase – Rubisco’s catalytic chaperone. **Photosynthesis Research** 75, 11–27.
- Raschke K, Baumann I, Hedrich R (1989) The “Blendor Method” for the preparation of guard-cell protoplasts in large numbers and from leaves with adhering epidermis. **Plant Physiol** 89: S-148 (Abstract 885)
- Rodríguez-López M, Baroja-Fernández E, Zanduetta-Criado A, Moreno-Bruna B, Munoz FJ, Akazawa T, Pozueta-Romero J (2001) Two isoforms of a nucleotide-sugar pyrophosphatase/phosphodiesterase from barley leaves (*Hordeum vulgare* L.) are distinct oligomers of HvGLP1, a germin-like protein. **FEBS Letters** 490: 44-48
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols** 1 (6): 2856-2860
- Shimazaki K-I, Zeiger E (1985) Cyclic and non-cyclic photophosphorylation in isolated guard cell chloroplasts from *Vicia faba* L. **Plant Physiol** 78: 211–214
- Souza MV, Fontes W, Ricart CAO (1999) Análise de Proteomas: O despertar da era pós genômica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** 2: 12-14
- Von Caemmerer S, Lawson T, Oxborough K, Baker NR, Andrews TJ, Raines CA (2004) Stomatal conductance does not correlate with photosynthetic capacity in transgenic tobacco with reduced amounts of Rubisco. **J Exp Bot** 55 (400): 1157-1166

- Wei Wang W, Scali M, Vignani R, Spadafora A, Sensi E, Mazzuca S, Cresti M (2003) Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis** 24: 2369–2375
- Wang P and Song CP (2008) Guard-cell signaling for hydrogen peroxide and abscísico acid. **New Phytol** 178: 703–718
- Westermeyer R (2001) Electrophoresis in practice: A guide to methods and applications of DNA an proteins sepatons. 349 p
- Wilkins MR, Sanches JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL (1995) Progress whith Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by Genome Should be Identified and How to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews** 13: 19-50
- Zhao Z, Zhang W, Stanley BA, Assmann SM (2008) Functional proteomics of *Arabidopsis thaliana* guard cells uncovers new stomatal signaling pathways. **Plant Cell** 20: 3210–3226
- Zhu M, Dai S, McClung S, Yan X, Chen S (2009) Functional differentiation of *Brassica napus* guard cells and mesophyll cells revealed by comparative proteomics. **Mol Cell Proteomics** 8(4): 752–66