

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA FUNCIONAL E MOLECULAR**

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE *Arabidopsis thaliana* e  
*Saccharum spp* ENVOLVIDOS NA RESPOSTA AO FRIO E ÓXIDO  
NÍTRICO.**

**Tese apresentada ao Instituto  
de Biologia da Universidade Estadual  
de Campinas para obtenção do título  
de Doutor em Biologia Funcional  
e Molecular na área de Bioquímica**

**Aluno: Antônio Paulino da Costa Netto**

**Orientador: Prof. Dr Marcelo Menossi Teixeira**

**Campinas, SP**

Data da Defesa: 23/04/2004

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcelo Menossi (Orientador)

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

-----  
Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

-----  
Assinatura

Dr. Jirí Borecký

-----  
Assinatura

Prof.Dr. Eduardo Galembeck

-----  
Assinatura

Prof. Dr. Michel G. A. Vincentz (Suplente)

-----  
Assinatura

Dra. Adriana Natalício Capella (Suplente)

-----  
Assinatura

“Eu guardo, para todos aqueles que de uma ou outra forma contribuíram para fazer-me mais grata a vida, uma eterna gratidão, e estampo nessa gratidão a lealdade com que conservo essa recordação, a qual jamais pôde empalidecer ali onde se encerra tudo quanto constitui a história de minha vida.”

Carlos Bernardo Gongález Pecotche

A minha esposa Dinara Pereira Lemos, pelo  
companheirismo, dedicação, solidariedade, e amor,  
durante os momentos mais difíceis e tensos, assim como,  
pela construtiva convivência nestes últimos tempos

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por manter forte minha fé e perseverança.

Aos meus pais, Juscelino Paulino da Costa e Dalva Vítor da Costa.

Ao CNPq pela concessão da Bolsa de estudos.

A Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em especial ao Instituto de Biologia e ao Departamento de Biologia Funcional e Molecular pela oportunidade concedida.

Ao professor Marcelo Menossi Teixeira, por confiar na minha pessoa e no meu trabalho, pela orientação, pelo exemplo pessoal e profissional que formam um cientista.

As professoras Eneida de Paula, Alba Regina Monteiro Souza Brito e Denise Vaz de Macedo por me confiar uma nova oportunidade no curso.

Ao professor Marcelo Oliveira e a Silvia Shishido pela síntese do GSNO.

Aos professores Hiroshi Aoyama, Carlos Ramos, Michel Vincentz, pelas importantes sugestões durante a pré banca.

Aos professores que aceitaram o convite para compor a banca colaborando com os resultados apresentados nesse trabalho.

A todos os professores dos cursos de Biologia Funcional e Molecular e de Fisiologia Vegetal, em especial aos docentes Eduardo Galembeck, Carmem Veríssima, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira e Nilce Correa Meirelles.

Aos companheiros de trabalho, Juliana Felix, Geraldo Cançado, Jorge Mondego, Renato Vicentini, Cristiani Rocha, Rodrigo Duarte, Sandra Camargo, Melina Duarte, Lígia Petrolini, Lucia Matiello, Caroline Paganucci, Márcio Fukada, Paulo Schlögl, Fábio Tebaldi, Vicente de Rosa Júnior, Luciane Gauer, Adriana Capela, Janaina dos Prazeres, Daniela Beck, Marcelo Surpilli, Eurípedes Ribeiro, Júlio e Ana Olívia.

Aos amigos de curso Luzia Modolo, Paulo Granjeiro, Paulo Castilho, José Antônio, Dulcinéia, Cláudia, Alessandra, Clúdio Zoppi, Marcos Smolka, Daniela Yokaichiya, Luciana, Soraya, Luzia, Ana Paula Demassi, Vitor, Diana, Raquel, Maricene, Cíntia, Marcos Scaff, Ana Deckmam, Gisele, Carla, Denis Ubeda, Henrique, Ilka Nassif.

Aos funcionários Edna, Dulce, Francisco, Jusceley, Kiko, Andréa, Marina, Miriam, Paulo Baldaço, Neto, Daniel, Juliana Matoso, Tânia e Sandra.

A Fundação Logosófica de Campinas.

A todos que de alguma forma se fizeram presentes.

## ÍNDICE

RESUMO	IX
SUMMARY	X
1) INTRODUÇÃO	1
2) REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1) Síntese do NO, estrutura e isoformas das NOS	3
2.2) NO e NOS em vegetais	5
2.3) Isoformas NOS em plantas	8
2.4) Envolvimento do NO na resposta ao ataque de fitopatógenos	8
2.5) Resposta de plantas ao frio	10
2.6) Processo de transformação de plantas via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
2.7) Análise de promotores via atividade GUS	16
2.8) Localização subcelular de proteínas fusionadas a GFP	17
3) OBJETIVOS	19
4) MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1) Material biológico e tratamentos	20
4.2) Clonagem do gene <i>HHP</i>	22
4.3) Seqüenciamento	23
4.4) Extração de RNA	23
4.5) Transferência de ácidos nucleicos para membranas de náilon	24
4.5.1) Géis de RNA	24
4.5.2) Macroarranjos de DNA	24
4.6) Marcação radioativa de sondas	25
4.6.1) Sondas para northern blot	25
4.6.2) Sondas de cDNA para macroarranjos	25
4.7) Hibridação das membranas de RNA e dos macroarranjos	26
4.8) Intensidade de sinal detectado em northern blot e macroarranjos	26
4.9) Produção dos cassetes de expressão	27
4.9.1) Cassete para superexpressão do gene <i>HHP</i>	27
4.9.2) Cassete para silenciamento do gene <i>HHP</i>	28

4.9.3) Cassete para fusão promotor <i>HHP</i> :GUS	29
4.9.4) Cassete para fusão HHP:GFP	30
4.10) Transformação, mini preparação de DNA plasmidial e <i>southern blot</i> de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
4.11) Transformação de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e seleção de plantas transformadas	32
4.12) Análise da segregação do gene <i>HHP</i> nas plantas transformadas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
4.13) Atividade Gus	34
5) RESULTADOS	35
5.1) Análises de domínios e alinhamento da proteína HHP	35
5.2) Localização subcelular da proteína HHP fusionada com GFP	41
5.3) Análise da expressão do gene <i>HHP</i>	42
5.4) Caracterização do gene <i>HHP</i> em plantas transgênicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
5.4.1) Obtenção de plantas transgênicas	45
5.4.2) Análise da expressão do gene <i>HHP</i> em plantas transgênicas	48
5.4.3) Resposta dos clones HHP ao frio	49
5.5) Análise da expressão do promotor HHP	51
5.6) Análise da expressão gênica em células de cana de açúcar em resposta a doadores de NO	52
5.6.1) Liberação de NO pelo GSNO	52
5.6.2) Construção dos macroarranjos de ESTs de cana de açúcar	53
5.6.3) Hibridação dos macroarranjos	54
5.6.4) Caracterização dos genes modulados por NO	56
6) DISCUSSÃO	62
7) ARTIGO: Evaluation of the performance of different plastics used to seal nylon cDNA arrays	64
8) CONCLUSÕES	71
9) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
10) APÊNDICE	84

## LISTAS DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1) Mapa com a orientação da construção pRTHHP	28
Figura 2) Mapa com a orientação da construção pAntisense	29
Figura 3) Mapa com a orientação da construção pHHPGUS	30
Figura 4) Mapa com a orientação da construção HHPGFP	31
Figura 5) Região promotora e codificante do gene <i>HHP</i> segundo anotação do Banco de dados do NCBI ( número de acesso CAB51217.1)	37
Figura 6) Seqüência do cDNA do gene <i>HHP</i> clonado por PCR	38
Figura 7) Alinhamento da seqüência do cDNA do gene <i>HHP</i> clonado por PCR com a seqüência do cDNA descrita por Guo et al.(2003), número de acesso NM_180335	40
Figura 8) Localização subcelular da proteína HHP fusionada à GFP em epiderme de cebola	41
Figura 9) Expressão do gene <i>HHP</i> em diferentes partes da planta de <i>Arabidopsis</i>	43
Figura 10) Expressão do gene <i>HHP</i> em plantas de <i>Arabidopsis</i> expostas ao frio	44
Figura 11) Seleção de plantas transgênicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	46
Figura 12) Expressão do gene <i>HHP</i> em plantas selvagens, antisenso e de superexpressão	49
Figura 13) Expressão do gene <i>HHP</i> na resposta a baixas temperaturas, plantas selvagens, antisenso e senso	50
Figura 14) Atividade GUS em plantas de <i>Arabidopsis</i>	51
Figura 15) Taxa de liberação de NO pela decomposição do GSNO em meio aquoso	53
Figura 16) Perfil de expressão de genes induzidos e reprimidos de cana de açúcar pela presença de doadores de NO	58
Figura 17) Expressão do gene que codifica aminotransferase em resposta a doadores de NO	60
Tabela 1) Análise de segregação das plantas transformadas com as construções pRTHHP e pAntisense	47

Tabela 2) Genes induzidos e reprimidos de cana de açúcar pela presença de doadores de NO	57
Tabela 3) Análise <i>in silico</i> de genes induzidos em cana de açúcar pela presença de doadores de NO quanto a sua função	61



## RESUMO

O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa de nitrogênio relativamente instável e possui grande versatilidade. Ele atua como mensageiro secundário, sendo inclusive citotóxico dependendo da sua concentração. Ações do NO como mensageiro secundário são descritas na neurotransmissão, regulação da circulação sanguínea e de processos inflamatórios, principalmente em mamíferos onde a enzima NO-sintase (NOS) foi descoberta. Em plantas, o NO possui importante papel na interação planta-patógeno, na expansão foliar e redução da velocidade de amadurecimento ou senescência de frutos e flores e no processo de apoptose, entre outros.

Recentemente duas isoformas de NOS de plantas foram caracterizadas em *Arabidopsis thaliana* e pouco se sabe da modulação da expressão gênica por NO em plantas. Este trabalho relata a clonagem e caracterização de um gene que codifica uma NOS de *A. thaliana* e a modulação da expressão gênica em cana-de-açúcar em resposta GSNO, um doador de NO.

A partir de seqüências depositadas no banco de dados do NCBI, foram sintetizados oligonucleotídeos específicos. A partir de reações de transcrição reversa e PCR o gene foi clonado e seqüenciado, sendo denominado *HHP*. O gene é mais expresso em folhas e flores e é induzido quando plantas de *A. thaliana* são submetidas a baixa temperatura. A localização subcelular da proteína foi determinada via fusão com GFP, sendo predominantemente plastídica. Plantas de *A. thaliana* superexpressando o gene *HHP* apresentaram uma melhora acentuada na resposta ao frio.

O efeito do NO na expressão gênica em cana-de-açúcar foi avaliado empregando macroarranjos de DNA. Foi detectado um aumento na expressão de alguns genes como por exemplo aminotransferases e peroxidases, além de proteínas com função ainda desconhecidas. Foi também demonstrada a influência dos plásticos que selam membranas com macroarranjos de DNA, onde compostos a partir de polietileno podem bloquear a emissão de radiação e diminuir o número de spots detectados, o que significa um menor número de genes avaliados

## SUMMARY

Nitric oxide (NO) is a reactive nitrogen species relatively unstable that has great versatility. NO acts as a secondary messenger and may be even cytotoxic, depending on its concentration. Actions of the NO as secondary messenger have been described in neurotransmission, regulation of the blood circulation and inflammatory processes mainly in mammals where the enzyme NO-synthase (NOS) was discovered. In plants, NO has important role in plant-pathogen interactions, in foliar expansion and in the maturation and senescence of fruits and flowers.

Recently two NO isoforms have been characterized in *Arabidopsis thaliana*, but we are far from a complete understanding of the NO effects on gene expression. This work reports the cloning and characterization of a NOS isoform from *A. thaliana* and the modulation of gene expression in sugarcane by NO donors.

Gene-specific oligonucleotides were designed based on the sequence of an animal NO-synthase deposited in the NCBI. After reverse-transcription and PCR the open reading frame was cloned and the gene was named *HHP*. The highest levels of gene expression were observed in leaves and flowers. *HHP* was induced by cold stress. The subcellular localization of the protein, determined using a GFP fusion, was predominantly plastidic. Transgenic *A. thaliana* superexpressing the *HHP* gene were more tolerant to cold stress.

The effect of NO on sugarcane cells was evaluated using DNA macroarrays. Several genes were found to be modulated by NO, such as those encoding an aminotransferase and a peroxidase. Surprisingly, most of them encode proteins with unknown function. The influence of plastics used to seal macroarray membranes was also evaluated. It was found that some of them block the radiation transmittance, reducing the number of detected spots and consequently the number of genes evaluated in the assay. These findings indicate that the choice of the sealing plastic is very important to obtain the maximum information from nylon arrays.

## 1) INTRODUÇÃO

A via enzimática para a produção do óxido nítrico (NO) tem despertado especial interesse em diversas áreas da ciência. Essa espécie reativa de nitrogênio é relativamente instável e possui propriedades lipofílicas, não necessitando de transportadores específicos para sua difusão pelas membranas biológicas (Mayer e Hemmens, 1997). Além disso, possui grande versatilidade, agindo como mensageiro secundário ou sendo citotóxico dependendo da sua concentração. São demonstradas na literatura várias atuações do NO como mensageiro secundário, sendo as mais conhecidas sua atuação na neurotransmissão, regulação da circulação sanguínea e de processos inflamatórios, principalmente em mamíferos onde a enzima NO-sintase (NOS) foi descoberta (Schmidt, et al., 1991). Com a descoberta das NOS observaram-se primeiramente três isoformas geneticamente distintas denominadas de NOS tipo I, NOS tipo II e NOS tipo III (Förstermann et al., 1991). A enzima responsável pela síntese do NO a partir da oxidação de L-arginina a L-citrulina encontra-se presente em todos grupos de vertebrados e invertebrados (Martínez, 1995), sugerindo que esta deva ser ancestral na evolução de eucariotos. Em plantas, pouco se sabe sobre os papéis desempenhados pelo NO e só recentemente foi clonado em *Arabidopsis thaliana* um gene que codifica uma NOS similar à de mamíferos (Guo et al., 2003). Sabe-se, no entanto que o NO pode atuar na germinação de sementes (Giba et al., 1994; Bowler et al., 1994; Giba e Konjevic, 1999), na indução de crescimento em raízes (Gôuvea et al. 1997), no sistema de defesa de plantas ao ataque de patógenos (Delledone et al. 1998; Durner et al. 1998; Bolwell, 1999; McDowell e Dangl, 2000; Wojataszek, 2000), na expansão foliar e redução na velocidade de amadurecimento ou senescência de frutos e flores (Leshem e Hamarat, 1996; Leshem et al. 1998), no processo de apoptose (Magalhães et al., 1999; Bolwell, 1999; Durner et al., 1999; Durner e Klessig, 1999 e McDowell e Dangl, 2000), e na inibição da proliferação de células de em suspensão (Saviani e Martins, 2000). Também se observa atividade específica de uma provável isoforma NOS de plantas e imunoreatividade entre anticorpos da

NOS de mamíferos com proteínas de plantas (Ribeiro Jr. Et al., 1999). Entretanto Chandok et al. (2003) descreveram uma possível isoforma de iNOS similar a proteína P envolvida na resposta ao ataque de patógenos.

## 2) REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1) Síntese do NO, estrutura e isoformas das NOS

O NO é sintetizado em tecidos animais por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS), composta por três isoformas geneticamente distintas (Förstermann et al., 1991), que realizam sua síntese a partir de L-arginina na presença de oxigênio molecular e NADPH. A oxidação do nitrogênio guanidínico terminal do aminoácido L-arginina ocorre através de uma reação complexa, com a participação de cofatores redox, formando um composto intermediário (NOH-ARG) que posteriormente é oxidado produzindo NO e L-citrulina (Leone et al., 1991, Mayer et al., 1991; Stuehr et al. 1991; Marletta, 1993, Griffith e Stuehr, 1995, Mayer e Hemmens, 1997). Cinco cofatores são necessários para a atividade da NOS: (1) heme, (2) NADPH, (3) FAD e FMN, (4) calmodulina, (5) tetrahydrobiopterina (BH4).

As três isoformas existentes de NOS foram identificadas inicialmente como bNOS, macNOS e ecNOS por terem sido isoladas originalmente de cérebro, macrófagos e endotélio, respectivamente. Verificou-se posteriormente que as diferentes isoformas podem ser expressas em vários tipos de tecidos, e que um determinado tecido pode expressar mais de uma isoforma de NOS. Para evitar confusão na nomenclatura, Förstermann et al. (1991) propuseram uma classificação numérica, baseada na ordem histórica da purificação e isolamento do cDNA das diferentes isoformas. Recentemente uma nova isoforma de NOS foi descrita em mitocôndrias (Kanai et al., 2001).

A isoforma I é  $\text{Ca}^{++}$  dependente e constitutivamente expressa no sistema nervoso central e periférico sendo inicialmente purificada de cerebelo de rato e porco (Bredt e Snyder, 1990; Mayer, John e Bohme, 1990; Schmidt et al., 1991). A isoforma I de cérebro é normalmente solúvel e migra com uma massa molecular de 150-160 kDa em gel de eletroforese de SDS-polyacrilamida (Bredt e Snyder, 1990; Schimidt et al., 1991).

A isoforma II é  $\text{Ca}^{++}$  independente, sendo encontrada em condições patológicas e induzida em macrófagos e em muitos outros tipos de células, representando um importante componente na atividade antimicrobial e antineoplásica. A isoforma II da NOS não é constitutivamente expressa, mas pode ser induzida em macrófagos, e em muitos outros tipos de células, pelo polissacarídeo bacteriano (LPS) e/ou citoquinas (Lowenstein et al., 1993; Xie, et al., 1993). Essa enzima purificada a partir de macrófagos de camundongos induzidos apresenta uma massa molecular de 125-135 kDa (Stuehr et al., 1991a; Hevel, et al., 1991).

A isoforma III, também  $\text{Ca}^{++}$  dependente, foi purificada primeiramente em células endoteliais de aorta de boi, nativas ou mantidas em cultura, apresenta uma massa molecular de 135 kDa (Pollock et al., 1991).

A NOS-I de cérebro (Bredt et al., 1991) e a NOS-III de endotélio (Lamas et al., 1992; Janssens et al., 1992) apresentam uma similaridade na seqüência de aminoácidos de 60%, mas são produtos de genes distintos (Lamas et al., 1992). A NOS-II de macrófago apresenta 50% de identidade com as outras isoformas (Lowenstein et al., 1992; Lyons et al., 1992; Xie et al., 1992), sendo o produto de um terceiro gene.

Apesar de se encontrar grande identidade entre as isoformas de NOS (50-60%), a isoforma II possui algumas diferenças com relação às isoformas I e III. Ela é independente de  $\text{Ca}^{++}$ /Calmodulina, sendo encontrada em condições patológicas, quando produz altas concentrações de NO (na ordem de nmols) e também possui atividade durante longos períodos (o que não acontece com as isoformas I e III).

A estrutura das isoformas da NOS são muito similares. Com a cristalização da enzima (Crane et al. 1997; Crane et al. 1998) ficou demonstrado que a fração redutase (C-terminal) da enzima possui alta homologia com o citocromo P450 redutase, apresentando sítios de ligação para NADH, FAD e FMN. Após o sítio de ligação ao FMN pode-se encontrar também o domínio Calmodulina (CAM), que está presente somente nas formas constitutivas. A porção oxigenase (N-terminal) da enzima apresenta um sítio de ligação para um grupamento Heme-Fe e outro

para Tetrahydrobiopterina (H4B). As evidências indicam que na região de ligação CAM e H4B ocorre a ligação entre dois monômeros formando então um dímero, sendo a partir daí observada atividade enzimática (Stuhert et al, 1989). Isso provavelmente acontece porque os domínios CAM, H4B e Heme-Fe, são mais hidrofóbicos e possuem mais resíduos de cisteína que podem formar pontes dissulfeto entre os monômeros. Segundo alguns autores (Masters, 1994) há ainda um equilíbrio entre monômeros e dímeros que pode regular a ação catalítica da enzima. O grupamento Heme-Fe está diretamente envolvido na catálise da reação (ligação da L-arginina); o grupo NADPH, atua como doador de elétrons da reação; os grupos FAD e FMN canalizam os elétrons do NADPH para o heme; a calmodulina tem o papel de desencadear a transferência de elétrons das flavinas para o heme na NOS-I e NOS-III. Na NOS-II este cofator está covalentemente ligado, mas requer  $Ca^{++}$  para desencadear seu papel fisiológico. A tetrahydrobiopterina (H4B) é necessária para atividade, embora sua exata função ainda não esteja esclarecida (Schmidt et al., 1994; Mayer et al. 1991, Klatt et al. 1992; Griffith e Stuehr, 1995; Stuehr, 1997; Crane, et al. 1997, Mayer e Hemmens, 1997; Crane et al. 1998).

## **2.2) NO e NOS em vegetais**

Embora se conheça muito pouco sobre a ocorrência e a função do NO em vegetais, trabalhos recentes têm sugerido um papel desse composto a partir da aplicação exógena, bem como estudos envolvendo atividade enzimática. Em plantas, estudos com a aplicação externa do gás NO demonstraram um aumento do nível de GMPc em *Picea abies* (Pfeiffer, 1994). Esse resultado está de acordo com a via de transdução de sinal em mamíferos, mediada por NO, na qual a guanilato ciclase é ativada pela formação de um complexo NO-heme, resultando num aumento da produção da 3', 5' - guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Niroomand et al., 1989). Leshem e Haramaty (1996) sugerem a ação do NO no processo de liberação do etileno e crescimento de plantas superiores, tanto como promotor quanto inibidor em função de concentração, ou ainda na redução da

velocidade de amadurecimento ou senescência de frutos e flores (Leshem et al., 1998).

Em mamíferos o óxido nítrico afeta também a respiração celular por inibição competitiva da citocromo c oxidase (Cleeter et al., 1994; Brown e Cooper, 1994; Cassina e Radi, 1996), sugerindo que NO funciona como regulador endógeno da cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa em mamíferos (Bates et al., 1996). No entanto, em planta há uma via conhecida como oxidase alternativa (OXA) que não é afetada pelo NO. Essa via seria um possível mecanismo de tolerância à produção de NO pela planta e/ou exógena proveniente de ambiente poluído (Millar e Day, 1996).

Algumas evidências sugerem que o sistema de geração de NO via óxido nítrico sintase possa existir em plantas superiores (Sen e Cheema, 1995; Martín et al., 1995; Cueto et al., 1996; Ninnemann e Maier, 1996). A imunoreatividade foi detectada para NOS-I em eixos embrionários de ervilha, em germe de trigo (Sen e Cheema, 1995) e em ápices de raízes e primórdios foliares de milho (Ribeiro Jr. et al., 1998). Segundo Barroso et al. (1999), uma provável isoforma de NOS é encontrada em peroxissomos de ervilha, pois há o reconhecimento de um peptídeo por anticorpos específicos para NOS de mamíferos. A utilização de um anticorpo específico para a região C-terminal (entre os resíduos 1131 e 1144 da iNOS de murídeo) aumenta a marcação dessa provável isoforma de NOS, confirmando a localização subcelular desse peptídeo na matriz de peroxissomos e de cloroplastos (Barroso et al., 1999). Além disso, NO e L-[14C] citrulina foram sintetizadas por raízes e nódulos de tremoço branco (*Lupinus albus*) (Cueto et al., 1996), por raízes de *Mucuna hassjoo* (Ninnemann e Maier, 1996), em ápices de raízes e primórdios foliares de milho (Ribeiro Jr. Et al., 1998), e em meio dependente de L-arginina, além da localização por coloração NADPH - diaforase (Cueto et al., 1996). Também são descritas ações do NO na germinação de sementes (Giba et al., 1994; Bowler et al., 1994; Keeley e Fortheringham, 1997; Giba, 1999), na indução do crescimento em raízes de milho (Gôuvea et al., 1997) e na proteção da morte celular em caso de injúrias causadas por herbicidas (Beligni e Lamattina, 1999). Recentemente foi relacionada a ação do NO com o



processo de apoptose, no qual essa molécula seria uma das responsáveis pelo desencadeamento de uma cascata que culmina com a morte celular programada (Magalhães et al., 1999; Durner et al., 1999; Durner e Kessing, 1999 e McDowell e Dangl, 2000).

Apesar das diferentes funções que o NO possui em plantas, discute-se até que ponto a produção do NO é oriunda da atividade de prováveis enzimas tipo NOS, recentemente clonadas em vegetais. Caro e Puntarulo (1998) sugerem que o NO pode ser também produzido a partir do  $\text{NO}_2^-$  oriundo da via redutase do nitrato. Recentemente vários autores (Giba et al., 1998; Giba e Konjevic, 1999; Yamasaki et al., 1999 e Wojtaszek, 2000) têm levantado essa hipótese pelo fato de que possivelmente um *pool* de  $\text{NO}_3^-$  geraria um *pool* de  $\text{NO}_2^-$  via redutase do nitrato, e este nitrito em meio ácido (em alguns compartimentos celulares) poderia gerar dióxido de nitrogênio, que por sua vez formaria o NO. Além disso, segundo Wojtaszek (2000), o NO também poderia ser sintetizado não enzimaticamente, pela atuação da energia radiante ( $h\nu$ ) nos carotenóides que compõe o sistema fotossintético. Nos últimos anos foram descritos relatos nos quais anticorpos que reconhecem NOS de animais podem identificar antígenos em plantas que não possuem atividade tipo NOS, como descrito por Butt et al. (2002) e Lo et al. (2000), reconhecendo dessa forma falsos positivos de isoformas NOS.

Por outro lado, existem evidências que suportam a existência de um sistema enzimático para a síntese de NO no reino vegetal, à semelhança do que acontece em animais. Alguns trabalhos destacam a atividade da NOS em células vegetais, determinadas pela formação de L-citrulina a partir de L-arginina (Martín et al., 1995; Cueto et al., 1996; Ninnemann e Maier, 1996; Delledone et al., 1998 ; Durner et al., 1998; Ribeiro Jr. et al., 1998, Ribeiro et al., 1999). A atividade NOS observada em raízes noduladas de leguminosas foi atribuída à presença de *Rhizobium spp.* (Cueto et al., 1996). Foi sugerido que o NO estaria envolvido no estabelecimento da simbiose como mediador na fixação do  $\text{N}_2$  atmosférico por se ligar nos grupamentos heme localizados nos centro redox da leghemoglobina ou fixL (Martín et al., 1998). Em outra importante observação, de Garcês et al. (2001) relatam a produção de NO em plantas nocaute para a via redutase do nitrato,

durante o processo de apoptose em folhas de *A. thaliana*, demonstrando que o NO foi produzido enzimaticamente.

### **2.3) Isoformas NOS em Plantas**

Recentemente alguns autores sugeriram a existência de uma enzima tipo NOS em plantas devido ao envolvimento deste radical na ativação das respostas de defesa (Durner e Klessig, 1999, Durner et al., 2001) e da reação imunológica entre anticorpos específicos para NOS de mamíferos e proteínas de plantas (Ribeiro et al., 1999; Barroso et al., 1999, Corpas et al. 2001). Sabe-se também que a atividade NOS de plantas origina-se da mesma forma que as de NOS de mamíferos, havendo uma diferença na sensibilidade da NOS de plantas aos inibidores específicos da NOS de mamíferos. Além disso, em mamíferos a atividade NOS é dependente do cofator tetrahydro-L-biopterina, cuja síntese ainda não foi descrita em plantas. Com a conclusão do genoma *A. thaliana*, foi descrito em 06/2000 nos bancos de dados duas regiões do DNA desta planta que possam codificar proteínas homólogas as isoformas neuronais de *Rattus norvegicus* e de *Helix pomatia*. Entretanto, a NOS de *Helix pomatia* não apresenta similaridade com as demais NOS descritas na literatura, possuindo uma massa molecular de 60 kDa, embora apresente atividade dependente de  $\text{Ca}^{++}$  e de NADPH, sendo inibida por N(G)-nitro-L-arginina (L-NNA) e por EGTA (Huang et al., 1997). Essa isoforma NOS foi recentemente clonada e caracterizada em plantas por Guo et al. (2003), confirmando que o NO pode ser gerado enzimaticamente em plantas.

### **2.4) Envolvimento do NO na resposta ao ataque de fitopatógenos.**

Recentes evidências sugerem que uma enzima tipo NOS está envolvida no mecanismo de defesa de plantas ao ataque de patógenos. Plantas atacadas por determinado patógeno, para o qual apresentam resistência, desenvolvem uma reação de hipersensibilidade que é caracterizada por uma necrose local do tecido. Essa reação inicialmente acontece por meio do desencadeamento de um

processo conhecido como "*burst oxidative*", que consiste na produção acentuada de espécies reativas de oxigênio (EROS), como o radical superóxido ( $O_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Roncato, 1997; Schimidt et al., 1998; Kochet al., 1998; Lamb & Dixon, 1997; Cazalé et al. 1998, Alvarez et al., 1998). Também são notadas mudanças no fluxo de íons e na estrutura da parede celular (Schaller e Oecking, 1999; Harding e Roberts, 1998; Tenhakem e Rübel, 1998; Chung, et al., 1997; Mensen, et al, 1998; Bredley, et al., 1994), a indução na expressão de vários genes da planta envolvidos na proteção e defesa celular (Levine et al., 1994; Jabs et al., 1997), e início do processo de morte celular do hospedeiro (Lamb & Dixon, 1997; Levine et al., 1994). Após o *burst oxidativo*, que "per se" não confere a reação hipersensitiva (Hammond-Kosak e Jones 1997; Parker e Colemam, 1997; Glazener et al., 1996), ocorre a produção de fitoalexinas, que têm ação microbicida, e a expressão de outros genes de defesa celular com a finalidade de aumentar ainda mais a resistência da planta ao patógeno (Halveson e Stacey, 1986; Kuc', 1995; Gestelem et al. 1998; Kristensem et al. 1997; Jabs et al., 1997; Levine et al., 1994).

A primeira evidência de que o NO poderia estar envolvido no mecanismo de defesa contra o ataque de fitopatógenos foi apresentado por Noritake et al. (1996). Esses autores observaram que a aplicação exógena de compostos doadores de NO em tubérculos de batata é capaz de induzir a produção da fitoalexina risitina. Elicidores preparados a partir da parede celular do fungo *Phytophthora infestans*, ao qual a variedade de batata utilizada apresenta resistência, também foram capazes de induzir a produção de risitina, que não foi inibida por substâncias capazes de quelar o NO. Esses resultados sugeriram aos autores que a via de sinalização desencadeada por NO não seria exatamente igual àquela estimulada por elicitores. Alguns estudos sugerem que o NO é necessário para que ocorra uma maximização das respostas hipersensitivas. Foi observado que inibidores das NOS comprometem a resposta de folhas de *A. thaliana* ao ataque de *Pseudomonas syringae* (Delledone et al., 1998). Observou-se também que plantas de fumo resistentes ao TMV possuem atividade NOS, e que doadores de NO ou a inoculação das plantas com NOS de mamíferos induzem a expressão de genes

para a síntese de proteínas de defesa como a fenil alanina amônia liase (PAL) e as proteínas de resistência PR (Durner et al. 1998).

Foi demonstrado ainda que a produção de fitoalexinas é induzida de forma dose-dependente por doador de NO (SNP), assim como por eliciadores oriundos do fungo *Diaporthe phaseolorum f. sp. meridionallis* (Costa-Netto et al., 1999; Modolo et al., 2000, Modolo et al., 2002), e que pelo uso de inibidores da NOS de mamíferos (L-NAME e AMINOGUANIDINA) notou-se um decréscimo na produção de fitoalexinas, à exceção dos tratamentos nos quais se usaram os doadores de NO (Modolo et al., 2002).

Da mesma forma na qual ocorre em células animais, os dados de literatura mostram que também em plantas o NO, dependendo da sua concentração, pode ser um agente protetor ou tóxico para as células. O equilíbrio dessa concentração pode determinar se há ou não síntese das substâncias de defesa ou indução da morte celular programada. Esses resultados representam fortes evidências de que o NO pode ter um papel fundamental no mecanismo de resistência de plantas ao ataque de patógenos.

## **2.5) Resposta de plantas ao frio**

O frio é um fator ambiental que freqüentemente desfavorece as condições ideais para a maioria das plantas em uma longa distribuição geográfica dos solos cultivados (Levit, 1980). A produtividade das plantas pode ser afetada de acordo com a tolerância de cada espécie ao resfriamento (temperaturas acima de 0 °C) ou ao congelamento (temperaturas abaixo de 0 °C).

Durante o processo de queda de temperatura várias mudanças são observadas devido aos efeitos diretos e indiretos do frio seja na expressão de genes ou na quantidade de sinalizadores celulares. Entre elas pode-se citar o aumento de endoglucanases e quitinases que auxiliam na diminuição do dano causado pelo congelamento da água no apoplasto em folhas de centeio de inverno (Xiao-Ming e Griffit, 1999); a acumulação de prolina e açúcares afim de manter o potencial osmótico sem levar as células a morte (Xin e Browse, 1998), ou

ainda alterações no particionamento de amido e sacarose recorrente da capacidade fotossintética em redirecionar o fluxo de carbono, aumentando a produção de sacarose e de fosfato inorgânico (Strand, et al., 1999). Outra importante informação descrita pela literatura é com relação a atuação do fotossistema II, luz e baixa temperatura, pois o gene *WCS19* atua na diminuição da excitação desse fotossistema em condições de baixa temperatura, inibindo dessa forma a fotoxidação dos cloroplastídeos. Essa proteína cloroplastídica é encontrada nos estromas de plantas de trigo, sendo observadas melhores respostas a plantas aclimatadas ao frio quando ocorre um aumento na expressão dessa proteína. Interessantemente essa proteína possui similaridade com proteínas do grupo 3 LEA que também conferem maior tolerância às baixas temperaturas e inclusive ao congelamento em cultivares de centeio e trigo. Plantas transgênicas de *Arabidopsis* que superexpressaram o gene *WCS19*, aclimatam-se melhor ao frio que plantas selvagens, segundo Ndong et al., (2002). Também são relatadas respostas ao frio pela ação de fitocromos devido aos dias curtos propiciados no inverno, por ativar vias induzidas por ABA, estimulando a expressão de desidrinas em plantas que superexpressaram o gene *PHY-A* (Welling et al., 2002).

Um importante fator na resposta ao frio é a variação no conteúdo de cálcio livre no citossol das células (Russell et al., 1996), regulada pela ação de canais de  $Ca^{++}$  no vacúolo (Knight e Knight, 2000) ou pela modificação da sinalização celular via  $IP_3$  em folhas de *Arabidopsis* (Knigh et al., 1996; De Nisi e Zocchi, 1996). Também são relatadas mudanças na concentração de  $Ca^{++}$  no núcleo, orientando dessa forma a expressão gênica em resposta ao frio via calmodulina, que foi demonstrado pela monitoração da expressão do gene *NpCaM-1* e *NpCaM-2* em tabaco (Luit et al., 1999), ou ainda pela ação do  $Ca^{++}$  no fechamento estomático independente da sinalização via ABA como constatado por Wilkinson et al., (2001) em folhas de *Commelina communis*.

Uma resposta comum à adaptação ao frio é a produção de radicais livres e  $H_2O_2$  que acumulam em altas concentrações quando comparado ao metabolismo normal (Prasad et al. 2001). Assim, é importante o balanço entre a produção de

radicais livres e a atividade dos sistemas anti-oxidantes das plantas, como por exemplo o conteúdo de glutatona e glutatona redutase, que conferem maior proteção ao frio em plantas de milho (Kocsy et al., 2001). A distribuição espacial das enzimas envolvidas no metabolismo de defesa e produção de radicais livres entre as diferentes estruturas anatômicas como as células da bainha vascular e do mesofilo demonstram que em plantas de milho a fonte e o dreno das espécies reativas de oxigênio são importantes na tolerância à baixas temperaturas. Foi observado que a diminuição da temperatura reduz o conteúdo de enzimas anti oxidantes nas células da bainha vascular de plantas de milho, conseqüentemente dificultando a aclimatação de plantas de milho ao frio (Pastori et al., 2000). Recentemente Lee et al. (2002) mostraram que mutantes de uma proteína similar ao complexo I da cadeia respiratória altera a expressão de vários genes nucleares relacionados ao frio, como *Cor15A*, *Cor47*, *Kin1* e *RD29A*. Esses mutantes acumulam espécies reativas de oxigênio, que solubilizam membranas e conseqüentemente permitem a passagem de corrente elétrica através das membranas, diminuindo assim a tolerância ao frio. Outros fatores adjacentes ao metabolismo aeróbico e a produção de EROS também são afetados em resposta ao frio, como a atividade de ATPases em plantas de abóbora (Ahn et al., 2000) e do aumento na expressão de proteínas desacopladoras de mitocôndrias (Maia et al., 1998).

A ação e o papel dos fitohormônios em resposta ao frio é um tópico que tem recebido grande atenção. Sabe-se que o etileno está envolvido na resposta ao congelamento por controlar a expressão de genes em folhas de Centeio de inverno (Yu et al, 2001). Outro fitohormônio muito estudado pela sua participação em resposta ao frio é o ABA, que aumenta o seu nível endógeno em cereais de inverno (Lalk e Dorffling, 1985; Veisz et al., 1996), e estimula a síntese de novo de proteínas em resposta ao frio (Guy et al., 1990; Welbaum et al., 1997; Hughes e Dunn, 1996). São observadas também mudanças na reorganização do citoesqueleto (Khokhlova et al., 1997) e na estabilidade das tubulinas (Puhakainen, 1995), sendo sugerida uma despolimerização dos microtúbulos como causa da injúria por frio. No entanto, o mesmo não foi observado em plantas

de algodão tratadas com ABA (Rikin, et al. 1983, e Olinevich et al. 2000) onde mostraram que o ABA diminui a estabilidade celular em trigo, promovendo alterações no citoesqueleto. Já Ukaji et al. (2001), demonstram que a proteína *WAP27* é similar ao grupo 3-LEA, expressa sazonalmente em amora, sendo induzida por ABA e encontrada em maior quantidade nos parênquimas de acordo com a intensidade do estresse dose dependente, não sendo detectada no verão.

Nos últimos anos aumentou-se o interesse em descobrir e caracterizar novos genes e promotores envolvidos nas respostas de plantas ao frio. Nesse aspecto merecem destaque genes similares aos conhecidos *COR* e seus promotores, que possuem uma repetição chamada de DRE/C e são regulados por uma via independente de ABA (Yamagushi-Shinozaki e Shinosaki 1994, Stckinger et al., 1997). A mutação do gene *HOS 1* de *A. thaliana* promoveu a indução de genes expressos em resposta ao frio mesmo em temperaturas normais, como os genes *RD29A*, *COR47*, *COR15A*, *KIN 1* e *ADH*. No entanto verificou-se também que esses genes são induzidos via ABA e por estresses que causam desidratação, como o estresse hídrico e polietileno glicol. Essa resposta em mutantes *HOS 1* indica que esse gene pode ser um regulador negativo no sinal de transdução em resposta ao frio em plantas, por controlar a expressão de genes relacionados a aclimação, congelamento e o tempo de florescimento de plantas de *arabidopsis* (Ishitani, et al., 1998).

Dentre os genes *COR* destaca-se a função do gene *COR15A* de *A. thaliana*, que atua diretamente na crio-proteção de cloroplastídeos, inibindo que as camadas de lipídeos entrem em colapso como ocorre na maioria das plantas não aclimatadas (Steponkus et al., 1993, 1998). A super expressão do gene *COR15A* aumentou a expressão de outros genes *COR* como o *COR6.6*, *COR47* e *COR78*. No entanto, é observada a expressão desses genes em temperaturas normais devido a ação de fatores de transcrição chamados de “CBF” (Shinwari et al., 1998). A superexpressão do fator de transcrição CBF1 em *Arabidopsis* mostrou a ativação da expressão dos genes *COR*, conferindo maior tolerância a plantas quando expostas à baixas temperaturas (Jaglo-Ottosen et al., 1998). Mutações no fator de transcrição CBF1 induziram a expressão de genes relacionados a

resposta ao frio e no fluxo de  $\text{Ca}^{++}$  (Knight, et al., 1999). A superexpressão do fator de transcrição CBF3 em arábido provocoou um aumento na expressão do fator de transcrição CBF1 ativando a expressão dos genes *COR* (Kasuga et al., 1999). Recentemente Gilmour et al., (2000) mostraram que os genes *CBF* realmente induzem uma rápida resposta a baixas temperaturas, pois a expressão de CBF3 em plantas transgênicas de arábido induzem a expressão dos gene *COR* em plantas não aclimatadas, ocorrendo um aumento de prolina e açúcares solúveis totais como sacarose, rafinose, glicose e frutose. Em plantas de arroz os genes *DREB1A/1B/1C/1D* e *2A* foram descritos, sendo que os genes *1A* e *1B* foram induzidos por frio e o gene *2A* induzido por desidratação e estresse salino. Quando o gene *DREB 1A* de arroz é superexpresso em arábido observa-se um aumento na tolerância ao congelamento, ao estresse salino e a desidratação das plantas transformadas, indicando a similaridade de função entre os genes de arábido e arroz, inclusive por controlar a expressão dos genes *COR15A*, *RD29A*, *KIN1* e *KIN2* (Dubouzet, et al., 2003).

A análise da resposta do transcriptoma com microarranjos mostrou que há uma grande similaridade na indução de genes induzidos por frio e por desidratação (Seki et al., 2001), segundo os autores isso acontece porque o fator de transcrição *DREB1A* modula a indução desses genes independente do tipo de estresse que o induziu. Foram encontrados 16 genes em ambos os casos, entre eles *RD29A*, *COR15A*, *KIN1*, *KIN2*, *RD17*. Em cana de açúcar, com o uso de macroarranjos foram encontrados 34 novos genes que respondem à baixas temperatura. Dentre eles genes *NAC* similares aos genes *NAC4* e *NAC6* de arroz, genes que codificam enzimas do sistema antioxidante como a xantina desidrogenase e superóxido dismutase; enzimas que atuam na síntese de carboidratos junto ao sistema fotossintético como piruvato ortofosfato diquinase, enzima málica dependente de NADP e transportador de açúcar. Também foi observado um aumento na expressão de genes envolvidos com a parede celular (celulose sintase), elementos de ligação ao DNA (*OCSBF-1*), e fatores ligados ao desenvolvimento celular, como o gene *ABI3* (Nogueira et al., 2003).



## 2.6) Processo de transformação de plantas via *Agrobacterium tumefaciens*

Há muitos anos as plantas cultivadas vêm sendo manipuladas pelo homem por meio do melhoramento clássico. No entanto, plantas transformadas geneticamente pelo homem são recentes, e se iniciaram através de uma nova abordagem: o uso das técnicas do DNA recombinante. Dessa forma foram superadas algumas limitações dos métodos de melhoramento genético clássico, como a redução do pool gênico e a incompatibilidade sexual. Assim, genes que codificam caracteres de interesse podem ser identificados e inseridos em variedades bem estabelecidas e economicamente importantes, além de abrir possibilidades ilimitadas para estudos da função dos genes.

O estabelecimento de plantas transgênicas com novas características é de suma importância, pois nos permitem avaliar modificações fenotípicas, visando o melhoramento de características agrônômicas e de qualidades nutricionais. Além disso, permite a utilização de plantas como bioreatores afim de se produzir produtos terapêuticos e de interesse industrial.

Um dos processos utilizados para se obter plantas transgênicas é a infecção por *Agrobacterium tumefaciens*. Essa bactéria tem a capacidade de transferir parte do DNA do seu plasmídeo Ti para o genoma das plantas que são suas hospedeiras (Hoekema et al., 1983; Rogers, et al., 1986). Esse método possui a deficiência de não ser eficiente em um grande grupo de plantas, especialmente as monocotiledôneas que apresentam recalcitrância à agroinfecção, provavelmente por não serem hospedeiras naturais de agrobactérias (Klein et al. 1987). No entanto, recentemente tem-se aumentado a eficiência de transformação e diminuído o tempo necessário para se obter plantas transformadas por agrobactéria, como descrito por Brasileiro e Dusi, (1998).

Dentre as plantas cultivadas, a *A. thaliana* destaca-se por possuir pequeno porte, ciclo de vida curto, genoma pequeno com poucas seqüências repetitivas de DNA, fácil manuseio e alta susceptibilidade a *Agrobacterium tumefaciens*, propiciando bons índices de transformação (Estelle e Somerville, 1986). Vários

métodos foram desenvolvidos para se obter plantas de *arabidopsis* transformadas via *agrobactérium*, como infiltração a vácuo (Benchtoold, 1993), transformação em tecidos radiculares e regeneração de plantas (Valvekens, et al., 1988), e recentemente pelo uso de detergentes para infiltração sem o uso de bombas a vácuo e co-cultura (Cough e Bent, 1998; Desfeux et al., 2000), facilitando o manuseio e a seleção de plantas transformadas.

## **2.7) Análise de promotores via atividade GUS**

O gene *GUS* codifica a enzima beta glucuronidase, e é comumente usado como gene marcador, principalmente devido a simplicidade, rapidez e versatilidade dos métodos de detecção da atividade enzimática. Adicionalmente, a maioria das plantas não apresenta atividade endógena significativa, e o ensaio possui boa sensibilidade e é de fácil utilização (Brasileiro et al., 1999). Além disso, a atividade GUS não requer co-fator, é bastante estável, resistente a diversos solventes e detergentes, e é ativa em uma ampla faixa de pH (5,0 a 9,0). A beta glucuronidase pode ser fusionada a outras seqüências podendo ser transportada para organelas como por exemplo cloroplastídeos (Jefferson & Wilson, 1991).

A beta glucuronidase é uma hidrolase que catalisa a clivagem de uma grande variedade de beta glucuronídeos, disponíveis comercialmente como substratos espectrofotométricos, fluorimétricos e histoquímicos. A presença ou ausência de GUS pode ser detectada, por intermédio da avaliação histoquímica, adicionando-se um substrato cromogênico o X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indol glucuronídeo), o qual sob ação da enzima forma um precipitado azul, resultado da dimerização do produto da hidrólise do X-GLUC.

A beta glucuronidase possui como desvantagens os ensaios destrutivos, ou ainda por haver algumas espécies e tecidos apresentarem atividade GUS detectável, mesmo sendo esta muito inferior à observada em plantas transgênicas (Plegt e Bino, 1989; Hodal et al., 1992 e Twell et al., 1989). Segundo Jefferson et al. (1986), a atividade GUS é uma ferramenta importante para a análise de promotores e na verificação da eficiência de transformação. O autor ainda

menciona que a atividade GUS tornou-se amplamente utilizada como gene repórter na avaliação da transformação de plantas, como por exemplo na avaliação de plantas de *Arabidopsis* transformadas para o estudo da biossíntese de lisina (Cracium, et al., 2000), na avaliação de recombinação homóloga de plantas que expressam a resolvase de bactéria (Shalev et al., 1999), na caracterização de uma nova glucanase em soja responsiva ao ataque de patógenos (Cheong et al., 2000), na verificação da eficiência de transformação de embriões de milho transformados por bombardeamento (Kemper et al., 1996) e na avaliação da expressão transitória do promotor *Hrgp* de milho (Menossi et al., 1997, 2003).

## **2.8) Localização subcelular de proteínas fusionadas a GFP**

A GFP (*Green Fluorescent Protein*) é uma proteína cujo gene foi clonado inicialmente na água viva *Aequorea victoria*, que possui a capacidade de absorver luz azul/violeta (entre 395 e 470 nm) e emitir fluorescência no comprimento de onda do Verde (508 nm). Isso acontece devido à presença de um cromóforo formado por ciclização e oxidação de polipeptídeos que compõe a estrutura da proteína tornado-a estável (Morin e Hastings, 1971, Morise, et al. 1974, Heim et al., 1994, Shimomura, 1979, Ward et al., 1980).

Graças ao seu pequeno tamanho (em torno de 238 resíduos de aminoácidos) e a sua natural função de converter luz azul em quimioluminescência a GFP tornou-se um importante gene repórter utilizado em *Escherichia coli* (Chalfie et al., 1994, Inouye e Tsuji, 1994, Crameri et al., 1996), *Caenorhabditis elegans* (Chalfie et al., 1994), Levedura (Beach e Bloom, 2001), *Drosophila melanogaster* (Wang e Hazelrigg, 1994), em tecidos de mamíferos (Olson et al., 1995, Brand, 1995) e em plantas (Wei e Cheng, 1995, Niedz et al., 1995, Haseloff et al., 1997).

Em plantas a GFP pode ser detectada *in vivo* em células, tecidos ou órgãos o que se torna vantajoso quando comparado com outros genes repórteres como GUS, e Luciferase (Niedz et al., 1995). Além disso, a GFP é mais estável que as

proteínas anteriores e somente pode ser desnaturada em condições extremas (Ward e Bokman, 1982).

A GFP já foi utilizada como gene repórter em protoplastos de *Citrus sinensis* (Niedz, et al., 1995), em mutantes de mono e dicotiledôneas (Reichel et al., 1996), na localização subcelular de mitocôndrias (Köhler et al., 1997), na investigação de alvos de RNA polimerases em mitocôndrias e cloroplastos de *A. thaliana* (Hedtke et al., 1999), no estudo de tamanho, formas e dinâmica de mitocôndrias em *A. thaliana* (Logan e Leaver, 2000), na regulação da fotomorfogênese de *A. thaliana* pelo gene *COP1* (Yamamoto et al., 2001), ou ainda no estudo da ação da calreticulina em suspensão de células de milho (Persson et al., 2002) entre outras.

Dessa forma a GFP atualmente é considerada um gene repórter estável e muito importante por permitir a visualização de proteínas *in vivo*, assim como a localização sub-celular do alvo em algumas organelas.

### 3) OBJETIVOS:

Este trabalho tem como objetivo aprofundar o conhecimento a respeito da ação do óxido nítrico em plantas. Assim, pretende-se caracterizar um gene de *Arabidopsis thaliana* que codifica uma NO sintase, bem como descrever as alterações na expressão gênica em cultura de células de cana de açúcar expostas a doadores de NO.

## 4) MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1) Material biológico e tratamentos

Em todos os ensaios foram usadas plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col-0). As sementes de arabisopsis foram embebidas em água estéril por 1 hora e esterilizadas com etanol 70% por 2 minutos e água sanitária 40% por 20 minutos, seguido de 6 lavagens com água estéril. As sementes foram então plaqueadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962; vide abaixo), repicadas semanalmente até a quarta semana de idade, e então foram coletados amostras de tecidos ou se iniciou os experimentos de análise da expressão gênica induzida pelo frio. O ensaio de resposta ao frio consistiu em se manter as plantas a 4 °C em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro de acordo com o descrito por Maia et al. (1998), procedendo-se as coletas com 3, 6, 12, 24 e 48 horas após a exposição ao frio e tratamento controle a temperatura de 19 °C coletado com 24 horas após o início dos tratamentos.

Foram usados dois meios de cultura em *A. thaliana*:

a) MEIO MS: Após a esterilização as sementes foram plaqueadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) meia força, composto por 2,15 g/L de sais MS (Gibco, EUA), 1 mL/L de vitaminas do meio B5 (Gamborg, 1966), 5 g/L de sacarose e 0,8% de agar purificado (select agar – Gibco, EUA), ajustados para pH 5,7 com NaOH.

b) MEIO MS de SELEÇÃO: É o meio MS acrescido de 50 µg/mL de canamicina.

Para os ensaios biológicos com cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) foi usado o cultivar SP80-3280. Os calos foram obtidos a partir de folhas jovens pela Cooperativa dos Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo Ltda (Copersucar). As células foram cultivadas *in vitro* em meio MS líquido (Murashige e SKoog, 1962) com vitaminas do meio B5 (Gamborg, 1966), 3 mg/L de 2,4 D, 20 g/L de sacarose, 150 mg/L de ácido cítrico e com pH ajustado para 5,7, com trocas a cada 7 dias. Após 21 dias sob agitação a 110 rpm as células

foram peneiradas afim de se obter uma cultura padronizada em 0,6 mm de diâmetro.

O doador GSNO foi sintetizado a partir de Glutathione ( $\gamma$ -Glu-Cys-Glu, GSH), HCl, Nitrito de Sódio ( $\text{NaNO}_2$ ), acetona e éter etílico (Sigma Chemical, EUA). Em todas as soluções usadas no preparo do GSNO foi utilizado água Milli-Q (Millipore, EUA) com sistema de filtração em gradiente. O S-nitrosoglutathione (GSNO) foi sintetizado a 25 °C pela relação equimolar de glutathione reduzida (GSH) na concentração de 200 mmol L<sup>-1</sup>, com solução de nitrito de sódio a 0,5 mol L<sup>-1</sup> HCl, de acordo com a metodologia descrita por Hart (1985). A solução final foi resfriada em banho de gelo com agitação por 40 minutos e precipitada com acetona. O sólido obtido foi filtrado e lavado 5 vezes em 5 mL de água gelada, 5 vezes com 5 mL de acetona e 3 vezes com 1 mL de éter etílico e liofilizada por 24 horas. O GSNO foi obtido na forma de cristais estáveis e puros, e armazenado em frascos protegidos da luz. Uma solução estoque de GSNO foi preparada dissolvendo o GSNO sólido em tampão tris-HCl pH 7.0.

O aumento espontâneo de NO livre em soluções aquosas de GSNO é caracterizada pelo monitoramento da diminuição de concentração de GSNO espectrofotometricamente, em um espectrofotômetro (Hewlett Packard, mod. 8435, Palo Alto, CA) com arranjos de diodo e controle de temperatura. Monitorou-se as mudanças de concentração do GSNO pela absorvância em 545 nm a cada 10 minutos, a 25 °C de acordo com de Oliveira et al., 2002. A diminuição da absorção de GSNO a 545 nm permite associar a quebra da ligação homolítica da ligação S-N (Shishido 2000), de acordo com a equação:



A quantidade de NO liberado neste tempo pode ser calculada pela mudança de concentração do GSNO de acordo com:

$$[\text{NO}]_t = [\text{GSNO}]_o - [\text{GSNO}]_t = (A_o/\epsilon_{\text{GSNO}}) - (A_t/\epsilon_{\text{GSNO}}) \quad (..)$$

Onde  $A_0$  e  $A_t$  são as absorvâncias das soluções monitoradas por um tempo  $t$ , respectivamente e  $\epsilon_{GSNO}$  é o coeficiente de extinção molar do GSNO em 545 nm, como descrito anteriormente (de Oliveira, 2002).

As células foram divididas em 24 erlenmeyers contendo 50 mL de cultura de células. Após uma semana o doador de NO (GSNO) foi adicionado de modo a possuir concentração final de 0,1 mM; 1,0 mM e 5,0 mM, todos em triplicata. Após 6 horas as células foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido sem a presença do meio de cultura.

#### 4.2) Clonagem do gene *HHP*

A clonagem foi realizada a partir de RNA total de tecidos foliares de *A. thaliana* (Col-0) por reação de RT-PCR. A transcrição reversa foi feita com o oligonucleotídeo 5'GTG AGA TTG TAA CCC TTT3'. 10  $\mu$ g de RNA total juntamente com o oligonucleotídeo para RT foram desnaturados a 70 °C por 10 minutos, e após resfriamento foram adicionados DTT, RNA GUARD, Tampão, 4DNTP e MgCl<sub>2</sub> nesta ordem respectivamente. Em seguida a reação de transcrição reversa se iniciou com a adição da enzima transcriptase reversa (Superscript II, Invitrogen, EUA), e incubação a 42 °C por 50 minutos. Após a incubação a reação de transcrição reversa foi inativada a 60 °C por 10 minutos.

A partir do cDNA foi realizada a reação de PCR com oligonucleotídeos Sense\_HHP 5` TCA Gcc atg gCG CTA CGA ACA CTC TCA ACG 3' e Asense\_HHP 5'Gga att cTT AGA AGC ACA CCC AGT TCT TTC TGC 3' que flanqueiam a região codificadora do gene. Os iniciadores contêm os sítios de restrição para as enzimas Nco I (sublinhado e minúscula) e Eco RI (minúscula), de forma a permitir a clonagem no vetor de expressão pRT104 (vide adiante). O DNA foi amplificado e clonado em pGEM-T easy (Promega, EUA), originando a construção pGTHHP. A construção foi confirmada por digestão em sítios de restrição que permitiram observar a orientação do cassete de expressão.



### 4.3) Seqüenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas com 500 a 800 ng de DNA plasmidial, 5 pmoles de oligonucleotídeo iniciador apropriado e 4  $\mu$ L de mistura de reação de Big Dye Terminator (ABI-PRISM, EUA) em um volume final de 15  $\mu$ L.

O perfil de amplificação foi de 96 °C por 1 min e 30 s seguido de 25 ciclos de 96 °C por 12 s 50 °C por 6 s e 60 °C por 4 min. Os produtos das reações foram purificados adicionando-se 80  $\mu$ L de isopropanol 75% incubando-se a temperatura ambiente por 15 min, e centrifugando-se por 20 min a 15000 rpm. Aos precipitados foram adicionados 250  $\mu$ L de isopropanol 75%, centrifugando-se por mais 5 min. Os precipitados foram secos e ressuspensos em 15  $\mu$ L tampão de corrida sendo aplicados em seqüenciador ABI PRISM 310.

### 4.4) Extração de RNA

Tecido dos órgãos raiz, caule, pecíolo, folha, flor, vagem verde e sementes de arabidopsis foram usadas na extração de RNA. Nos ensaios de indução por frio foi extraído RNA da parte aérea das plantas. Em ambos os casos os tecidos foram macerados em nitrogênio líquido e embebidos em 700  $\mu$ L de tampão de extração (8 M guanidina HCl, 50 mM de Tris HCl pH 8,0, 20 mM de EDTA pH 8,0, 50 mM beta mercaptoetanol) sob leve agitação por 3 min. Após a embebição foram adicionados 700  $\mu$ L de Fenol:Clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e as amostras agitadas vigorosamente em agitador tipo vortex. As amostras foram centrifugadas por 15 min a 4 °C e a fase superior foi transferida para um novo tubo. Foi adicionado 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) seguido de uma homogeneização vigorosa em vortex. As amostras foram novamente centrifugadas por 15 min a 4 °C e a fase superior transferida para um novo tubo. O RNA foi precipitado por duas horas a -20 °C em 0,2 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 1 volume de etanol absoluto, sendo que após essa incubação as amostras foram centrifugadas por 10 min a temperatura ambiente e o precipitado lavado

duas vezes com etanol 70%. O RNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspensionado em 10 a 30  $\mu$ L de água DEPC, de acordo com o descrito por Longemann et al., (1987).

Para a síntese de cDNA utilizada nos ensaios com cana de açúcar o RNA total foi extraído pelo uso de Trizol (Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante para extração de RNA em presença de polissacarídeos oriundos dos tecidos de origem.

#### **4.5) Transferência de ácidos nucleicos para membranas de náilon**

##### 4.5.1) Géis de RNA

Aproximadamente 10  $\mu$ g de RNA total de cada amostra foi submetido a uma corrida eletroforética em gel de agarose contendo formaldeído. O gel foi incubado por 10 minutos em água DEPC em temperatura ambiente e 10 min em SSC 10X para posterior transferência em membranas de náilon Hybond N+ (Amersham Biosciences, EUA) por capilaridade. As membranas foram fixadas em estufa por duas horas a 80 °C.

##### 4.5.2) Macroarranjos de DNA

A confecção dos macroarranjos de DNA ocorreu a partir das amostras de cDNA preparadas após lise de bactérias *E. Coli* contendo os plasmídeos de bibliotecas de EST de cana de açúcar do projeto SUCEST (Vettore et al., 2001). O DNA foi fixado em membrana de náilon possuindo 3840 e 2304 genes aleatórios de folha e raiz respectivamente, em membranas com 22,2 X 22,2 cm através do uso de um robô Q-Bot (Genetix, EUA) no BCCCenter (<http://bcccenter.fcav.unesp.br>) que gerencia os clones do projeto SUCEST.

Todos os spots foram re-arranjados e fixados em duplicata nas membranas.

## 4.6) Marcação radioativa de sondas

### 4.6.1) Sondas para *northern blot*

O produto de PCR do gene HHP, amplificado com óligos que flanqueiam a ORF (Sense\_HHP e Asense\_HHP) foi marcado com dCTP[<sup>32</sup>P] por meio da técnica de “*random priming*”, utilizando o kit Read to Go, segundo as condições sugeridas pelo fabricante (Amersham Biosciences, EUA). A sonda foi purificada em mini coluna Probe Quant G50 (Amersham Biosciences, EUA).

### 4.6.2) Sondas de cDNA para macroarranjos

Nos macroarranjos de DNA, a quantidade de cDNA presente em cada spot foi estimada através de uma sonda composta por oligonucleotídeos específicos para o gene que codifica a enzima que confere resistência ao antibiótico ampicilina, presente no vetor pSPORT1 (Invitrogen, USA) utilizado na construção das bibliotecas do SUCEST. Esta sonda, designada overgo, é sintetizada a partir dos primers 5'- GTG GTC CTG CAA CTT TAT CCG C -3' e 5'- TAG ACT GGA TGG AGG CGG ATA A-3' na presença de  $\alpha$ -dCTP[<sup>33</sup>P]. A hibridação com esta sonda overgo foi realizada por 16 h a 58°C, de acordo com o protocolo descrito por J.D. McPherson (<http://www.tree.caltech.edu/protocols/overgo.html>). Após a detecção da radiação as sondas foram retiradas por incubação em solução de SDS 0,1% fervente por 5 minutos duas vezes e armazenadas.

A síntese das sondas com  $\alpha$ -dCTP[<sup>33</sup>P], pré-hibridação, hibridação e lavagens foram realizadas de acordo com o descrito por Schummer et al (1999), exceto por purificar as sondas marcadas radioativamente em colunas G-50 (Amersham Biosciences, USA) antes da hibridação.

#### **4.7) Hibridação das membranas de RNA e dos macroarranjos**

A pré-hibridação e a hibridação foram realizadas segundo Sambrook et al, (1989). Depois de umedecida em 2 X SSC, a membrana foi colocada em um tubo de hibridação, onde foi adicionada a solução de pré-hibridação contendo 5X SSC, 5X Denhart's (0,1% ficol, 0,1% polivinil e 0,1% albumina bovina fração V em água), 1% SDS, 50 mM de fosfato de sódio pH 6,8, 50% de formamida deionizada e 100 µg/mL de solução de esperma de salmão desnaturado. A pré-hibridação transcorreu a 42 °C por no mínimo duas horas, sendo que, em seguida foi substituída pela solução de hibridação (5X SSC, 5% sulfato dextran, 1% SDS, 50% formamida deionizada e 20 mM de tampão fosfato de sódio pH 6,8) contendo sonda previamente marcada e desnaturada por 5 minutos em água fervente. A hibridação foi realizada a 42 °C durante 24 horas.

Após a hibridação, a membrana foi lavada 20 min em 0,2 X SSC e 0,1% de SDS a temperatura ambiente e, posteriormente, por 20 min a 65 °C na mesma solução.

A hibridação dos macroarranjos de DNA foi realizada tal como descrito por Nogueira et al. (2003), com cDNA sintetizados a partir da transcrição reversa de 30 µg de RNA total das culturas de células de cana de açúcar expostas ao doador de NO - GSNO nas concentrações finais de 0, 0,1 mM, 1,0 mM, e 5,0mM, marcados radioativamente.

#### **4.8) Intensidade de sinal detectado em *northern blot* e macroarranjos**

Nos estudos por northern blot, após as lavagens as membranas foram seladas e expostas em Imaging Plates para posterior revelação. As imagens foram obtidas por um FLA3000-G (Fuji Foto Filme, Japão) e quantificadas pelo software Image Gauge (Fuji Foto Filme, Japão).

Já nos macroarranjos, após a hibridação, lavagens e selagem das membranas, os macroarranjos foram expostos em Image Plates e após 96 horas

de exposição as imagens geradas foram captadas pelo aparelho FLA3000-G screen system (Fuji Foto Filme, Japão). A intensidade de radiação de cada spot digitalizada em imagens foi convertida em intensidade relativa e quantificada pelo uso do software *Arrayvision*<sup>TM</sup> (Imaging Research, Canada). A emissão de fundo (*background*) local de cada spot foi subtraída de sua intensidade relativa. Os dados foram manipulados com scripts desenvolvidos pela equipe de bioinformática de nosso grupo (<https://ipe.cbmeg.unicamp.br>).

#### **4.9) Produção dos cassetes de expressão**

Os cassetes de expressão foram construídos na base do vetor pCambia 2300 (CAMBIA, Austrália) que possui o sítio múltiplo de clonagem do vetor pUC18 e confere resistência a canamicina para a seleção de plantas transformadas, as construções produzidas são descritas abaixo:

##### **4.9.1) Cassete para superexpressão do gene *HHP***

O DNA do clone pGTHHP foi digerido com as enzimas Nco I e Eco R I e clonado no vetor pRT104 (Töpfer, 1987) previamente digerido com as mesmas enzimas. O clone pRT\_HHP foi digerido com Pst I para liberar o cassete de expressão, que foi então clonado no vetor pCambia 2300 (CAMBIA, Austrália) previamente digerido com a enzima Pst I.

A construção foi confirmada por digestão em sítios de restrição que permitiram observar a orientação do cassete de expressão e por seqüenciamento.

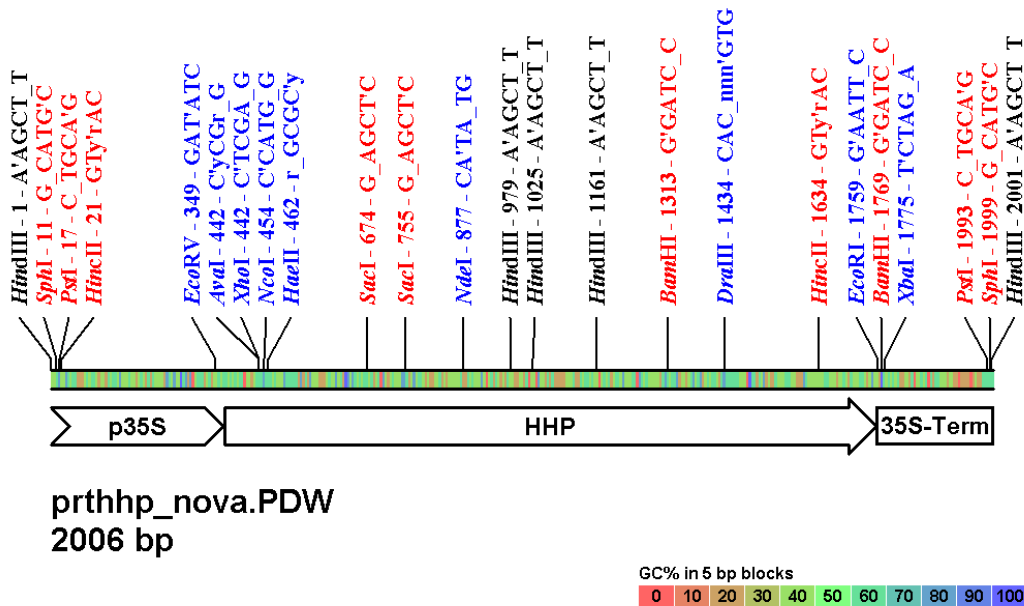


Figura 1) Mapa com a orientação da construção pRTHHP, realizada com subclonagem a partir do plasmídeo pRT104 (Töpfer, 1987) e finalizada em pCambia 2300 (CAMBIA, Austrália).

#### 4.9.2) Cassete para silenciamento do gene *HHP*

As etapas de clonagem para a construção do cassete antisenso do gene *HHP* foram as mesmas descritas no item 4.9.1. No entanto, na digestão dos clones contendo o gene *HHP* em pGEMTeasy (Promega, EUA) selecionaram-se clones que possuíam orientação inversa. Dessa forma foi produzido o cassete antisenso em pRT 101 (Töpfer, 1987) e posteriormente em pCambia 2300 (CAMBIA, Austrália), também confirmados por digestão e seqüenciamento.

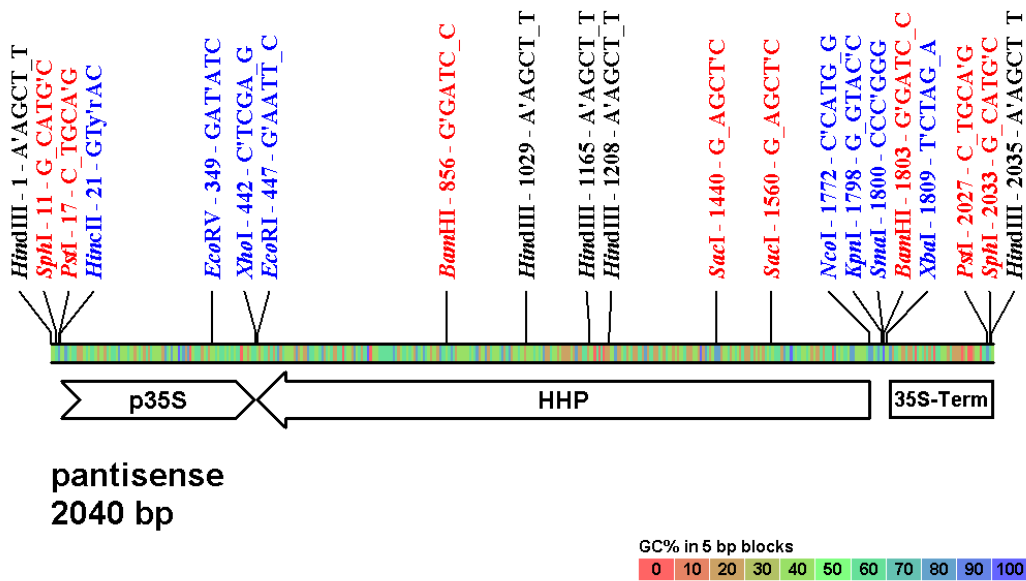


Figura 2) Mapa com a orientação da construção pAntisense, realizada com subclonagem a partir do plasmídeo pRT101 (Töpfer, 1987) e finalizada em pCambia 2300 (CAMBIA, Austrália).

#### 4.9.3) Cassete para fusão promotor *HHP*:GUS

O promotor do gene *HHP* foi obtido por PCR com oligonucleotídeos iniciadores Senseprom\_ *HHP* 5' tct aga CTC CTT TAT ATG CAT CTT TGTTG 3' e Asenseprom\_ *HHP* 5' gga tcc GTT CGT AGC GCCATT G 3' que flanqueiam a região promotora do gene, contendo em sua seqüência sítios de restrição para as enzimas Xba I (sublinhado e minúscula) e Bam HI (minúscula). O DNA foi amplificado e clonado em pGEM T easy (Promega, EUA) e digerido com as enzimas Xba I e Bam HI sendo clonado no vetor pBI 101.2 (CLONTECH, EUA), previamente digerido com as mesmas enzimas. A construção pHPGUS foi confirmada por seqüenciamento.

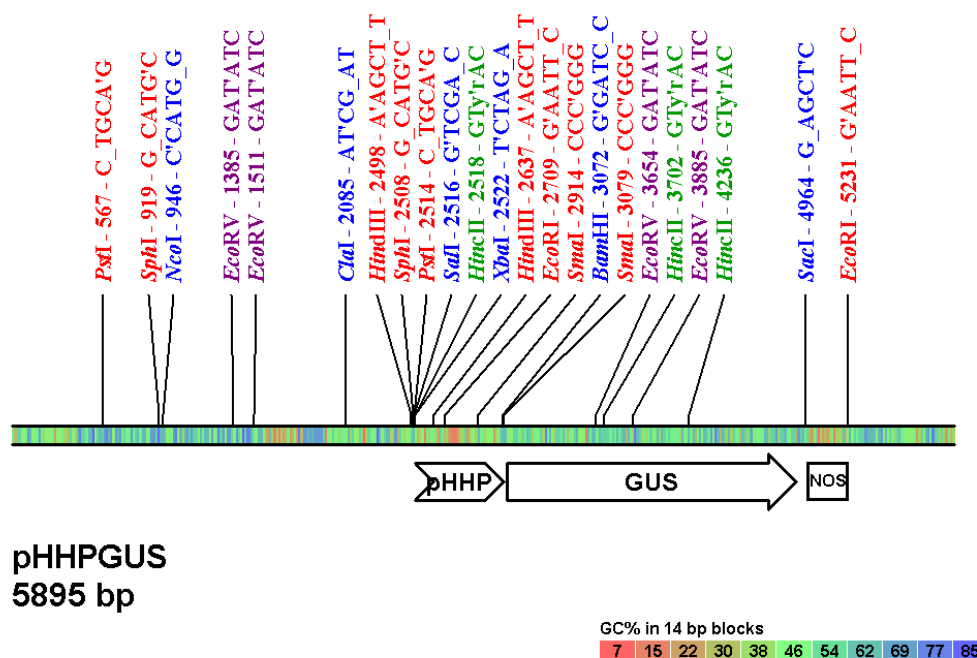


Figura 3) Mapa com a orientação da construção pHPGUS, realizada em pBI 101.2 (CLONTECH, EUA).

#### 4.9.4) Cassete para fusão HHP:GFP

A GFP foi clonada a partir do pCAMBIA 1302 (CAMBIA, Austrália) por Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) com oligonucleotídeos iniciadores Sense\_GFP 5' gag ctc ATG AGT AAA GGA GAA GAA G 3' e Asense\_GFP 5' tct aga TTA TTT GTA TAG TTC ATC CAT GCC 3'. Esses óligos flanqueiam a região codificante da mGFP5, contendo em sua seqüência sítios de restrição para as enzimas Sac I (sublinhado e minúscula) e Xba I (minúscula). O DNA foi amplificado e clonado em pGEM T easy (Promega, EUA). A construção pRTHHP foi digerida com NCO I e SAC I, liberando um fragmento de 332 pb que foi purificado e ligado ao fragmento GFP. O vetor pRT 104 (Töpfer, 1987) foi então digerido com as enzimas NCO I e XBA I sendo clonado com a construção HHP\_GFP, previamente digerido com as mesmas enzimas. A construção



pRTHHP\_GFP foi digerida com a enzima PST I e clonada em pCAMBIA 2300 (CAMBIA, Austrália). A construção pHHP\_GFP foi confirmada por digestão pelo uso da enzima HINC II.

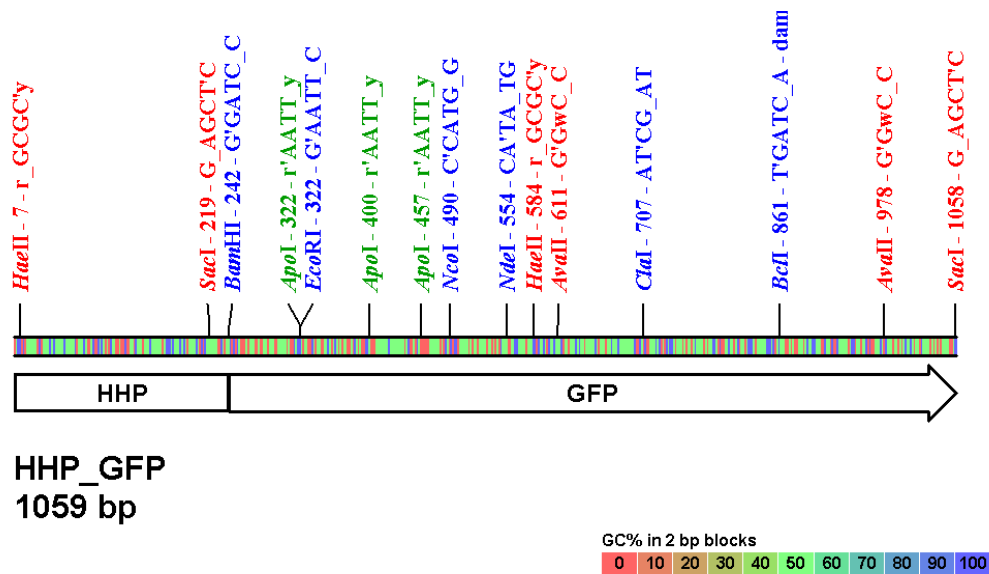


Figura 4) Mapa com a orientação da construção HHPGFP, realizada com subclonagem a partir do plasmídeo pRT104 (Töpfer, 1987) e finalizada em pCambia 2300 (CAMBIA, Austrália).

#### 4.10) Transformação, mini-preparação de DNA plasmidial e *southern blot* de *Agrobacterium tumefaciens*

A transferência do DNA plasmidial para as células competentes de *A. tumefaciens* foi realizada mediante a técnica de transformação direta. A linhagem GV3101 (Konchz e Schell, 1986) de *A. tumefaciens* foi utilizada para transformar *A. thaliana*, onde células competentes de agrobactérias foram transformadas com 1 µg do plasmídeo de interesse, plaqueadas e incubadas a 28 °C por 2 a 3 dias até o aparecimento de colônias bem definidas.

Após o plaqueamento realizou-se a mini prep e southern blot para se verificar a integridade do plasmídeo. A mini prep de DNA plasmidial das agrobactérias foi realizada a partir da inoculação de 1 colônia isolada em 5 mL de

LB/Gentamicina, incubados a 28 °C com agitação de 300 rpm por 12 a 16 horas até atingir a absorbância a 600 nm entre 0,5 e 0,6. Em seguida realizou-se a lise alcalina da cultura com a posterior precipitação e purificação do DNA plasmidial. Após a mini preparação do DNA plasmidial extraído de agrobactérias transformadas foi realizada a digestão dos plasmídeos com as enzimas de restrição Xba I e Sac I para a construção pHHPGUS, Pst I e Bam HI para as construções pHHPsense e antisense seguido de *Southern blot* das amostras de agrobactérias transformadas, onde foram usadas como sondas 35s e GUS para as construções pHHPsense e antisense e pHHPGUS respectivamente.

O *Southern blot* foi realizado pelo método neutro a partir da migração das amostras em gel de agarose, seguido de transferência para membranas por capilaridade. As membranas foram pré hibridadas por duas horas e hibridadas por uma noite como descrito no EMBO Practical Course on Genetic and Molecular Analysis (<http://www.isv.cnrs-gif.fr/EMBO/manuals/>). Após a hibridação a membrana foi lavada por 15 min à temperatura ambiente, seguida de lavagem pré-aquecida por 30 min a 75 °C, sendo selada e exposta em Images Plates para posterior revelação. Para a obtenção das imagens digitalizadas foi usado um FLA3000-G (Fuji Foto Filme, Japão).

#### **4.11) Transformação de plantas de *Arabidopsis thaliana* via *Agrobacterium tumefaciens* e seleção de plantas transformadas**

Plantas de *A. thaliana* cultivar Columbia (Col-0), foram plaqueadas e cultivadas em meio MS por 4 semanas, sendo mantidas em câmara de crescimento a 19 °C e fotoperíodo de 16 h de Luz. Após quatro semanas as plantas foram transferidas para vasos contendo vermiculita e composto orgânico na proporção de 1:1. Antes de iniciar o florescimento as plantas foram transformadas com agrobactéria.

Uma colônia de agrobactéria já confirmada por *Southern blot*, foi inoculada em 5 mL de LB/Gentamicina/Canamicina (pré inoculo) até atingir Absorbância entre 0,5 e 0,6. Em seguida foi realizada uma inoculação com 1 mL de pré inoculo

em 10 mL de meio LB/Gentamicina/Canamicina, monitorando-se o crescimento do inoculo até atingir Absorbância entre 0,5 e 0,6, quando nova diluição foi realizada usando 5 mL de inóculo para 1000 mL de LB/Gentamicina/Canamicina. Quando o inoculo atingiu absorbância entre 0,8 e 1,0 foi realizada centrifugação a 8000 rpm a 4 °C, e o precipitado de agrobactérias foi ressuspendido em 330 mL de solução de sacarose a 5% (p/v), contendo 100 µL de Silwet (Lehle Seeds, EUA). Essa solução homogeneizada foi pulverizada nas plantas de *A. thaliana*. A pulverização foi repetida uma semana mais tarde.

Após a transformação as sementes produzidas pelas plantas foram plaqueadas em meio MS de seleção a fim de se identificar as plantas transformadas.

#### **4.12) Análise da segregação do gene *HHP* nas plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana***

As sementes das plantas selecionadas em canamicina foram semeadas em meio MS de seleção para inferir o número aproximado de “loci” do gene de interesse inserido no genoma da planta, através da proporção de segregação entre plantas resistentes e sensíveis ao antibiótico. As plântulas não resistentes a canamicina apresentaram aspecto amarelado e/ou morreram, enquanto plântulas resistentes apresentaram fenótipo normal. Essas plântulas com fenótipos normais (R0) foram cultivadas em meio de seleção até quatro semanas de idade e transplantadas para solo, sendo cultivadas até a produção de sementes em aparato que não permitiu a polinização cruzada das plantas. Essas sementes foram novamente plaqueadas a fim de se saber a segregação dos genes e, as plântulas com fenótipos normais (R1) foram cultivadas e auto fecundadas, sendo as semente dessas plantas (R2) foram também plaqueadas em meio seletivo para a análise de segregação, onde se selecionaram plantas homozigotas para os posteriores estudos.

#### 4.13) Atividade GUS

Para o ensaio histoquímico de atividade GUS foi utilizado tampão de reação ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  100 mM,  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0,5 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Triton X-100 0,1%, X-GLUC 50mg/mL e  $\text{H}_2\text{O}$ ). Neste ensaio foram utilizadas plantas selvagens, transformadas com pBi121 (contendo o cassete p35S:GUS:NOS) e transformadas com a construção pHPGUS. As amostras foram colocadas em solução de reação durante 24 horas a 37 °C. As amostras foram transferidas para etanol 70% para a extração da clorofila até a visualização do precipitado azul oriundo da atividade GUS.

## 5) RESULTADOS

### 5.1) Análises de domínios e alinhamento da proteína HHP

O gene *HHP* está localizado no cromossomo 3 do genoma *A. thaliana* entre as posições 17494053 e 17497332. A região codificante tem 3279 pb possuindo 11 introns e 12 exons, com uma ORF de 1326 pb (número de acesso CAB51217.1). Sua região promotora possui 515 pb localizada no cromossomo 3 de *Arabidopsis* segundo anotação apresentada no banco de dados do NCBI. A seqüência do gene é mostrada na figura 5.

A proteína deduzida a partir da anotação do NCBI possui o domínio COG1161 entre os resíduos 140 e 370. Esse domínio está relacionado com a atividade GTPase. No entanto não foram encontrados domínios comuns às demais isoformas de NOS, com Heme, NADPH, FAD, FMN, Calmodulina e Tetrahydrobiopterina, da mesma forma que na isoforma NOS descrita em *Helix pomatia*.

Outra observação interessante com relação a proteína HHP diz respeito que os 28 aminoácidos iniciais (MALRTLSTFP SLPRRHHTTTR REPNLTVI) podem ser um provável peptídeo sinal para localização em mitocôndrias e cloroplastídeos, de acordo com o software iPSORT (Bannai et al., 2003, disponível gratuitamente na internet em <http://HypothesisCreator.net/iPSORT/index.html>). Nenhum domínio transmembrana foi identificado.

A clonagem do gene *HHP* foi realizada por reações de transcrição reversa e PCR com óligos construídos a partir da seqüência genômica. Após a clonagem as extremidades do gene foram seqüenciadas mostrando conformidade com o esperado. A partir desse fragmento foram realizadas as construções dos cassetes de superexpressão e silenciamento, bem como as análises de expressão do gene *HHP*. No entanto, com a clonagem e caracterização do gene publicada em novembro de 2003, observamos que provavelmente ocorreu um erro de anotação desse gene quando ele foi depositado no banco de dados do NCBI. Então, a partir

dos dados apresentados por Guo et al. (2003), acesso NM\_180335, foi realizado um alinhamento desta com a seqüência do gene *HHP* clonado por nós (Figura 6). Observa-se que o gene *HHP* possui alta identidade com a isoforma NOS descrita por Guo et al. (2003) (Figura 7), tratando-se então do mesmo gene. No entanto, foi constatada uma diferença entre o tamanho dos genes (Figura 7), sendo o gene *HHP* 338 pb menor que a isoforma descrita por Guo et al. (2003). Através dessa análise observamos então que a clonagem do gene *HHP* na verdade produziu uma forma “truncada” do gene, onde uma parte da região C-Terminal não foi clonada.

Vale a pena ressaltar que a porção amino-terminal onde se encontra o peptídeo sinal não foi alterada em nenhum dos alinhamentos, ficando intacta. Outra informação importante é que sem uma porção da parte C-Terminal, os dados de superexpressão precisam de uma posterior confirmação com dados de atividade, enquanto os resultados de silenciamento não são alterados devido a alta identidade entre os clones.



```

M A L R T L S T F P S L P R R H T T T R
1 ATGGCGCTACGAACACTCTCAACGTTTCTTCTCTCCTCGTCGCCACACAACGACGAGA
R E P N L T V I Y R N P T T S I V C K S
61 CGTGAACCCAATCTCACCGTCATTTACCGTAATCCGACGACATCAATCGTCTGTAAATCA
I A N S E P P V S L S E R D G F A A A A
122 ATAGCTAATTCAGAACCACCAGTTTCACTCTCGGAACGAGATGGATTTGCGGCGGCTGCT
P T P G E R F L E N Q R A H E A Q K V V
182 CCAACCCCTGGAGAAAAGGTTCTGGAGAACCAACGAGCTCATGAAGCTCAGAAAGTAGTG
E I I A R K V V D T S V S C C Y G C G A
242 GAGATTATTGCACGAAAAGTTGTTGATACCTCAGTCTCATGTTGTTACGGCTGCGGAGCT
P L Q T S D V D S P G F V D L V T Y E L
302 CCGTTACAAACTTCCGACGTCGATTCTCCGGGATTTGTCGATTTGGTTACTTATGAATTG
K K H H Q L R T M I C G R C Q L L S H G
362 AAGAAGCATCACCAGTTAAGAACTATGATATGTGGAAGATGTCAGCTATTGTCACATGGA
H M I T A V G G N G G Y P G G K Q F V S
422 CATATGATTACGACGTTGGTGGTAATGGAGGTTATCCAGTGGGAAACAATTTGTATCA
A D E L R E K L S H L R H E K A L I V K
482 GCTGATGAACTTCTGAGAAAACCTTCTCATTTACGCCATGAGAAAGCTTTGATTGTTAAA
L V V D I V D F N G S F L A R V R D L V
542 TTGGTGGTTGATATAGTGGATTTTTAATGGAAGCTTTTTAGCTCGTGTTCGTGATTTAGTT
G A N P I I L V I T K I D L L P K G T D
602 GGAGCTAATCCGATTATACTTGTATAACTAAGATTGATCTTCTTCCAAAAGGAACGGAT
M N C I G D W V V E V T M R K K L N V L
662 ATGAATTGTATCGGGGATTGGGTTGTGGAAGTGACCATGAGGAAAAAGCTTAATGTCTTG
S V H L T S S K S L D G V S G V A S E I
722 AGTGTCATCTCACAAAGTTCAAAGTCCCTGGATGGAGTTAGCGGAGTTGCATCAGAGATC
Q K E K K G A A N V G K S A F I N A L L
782 CAGAAGGAGAAAAAGGGTGCAGCTAACGTAGGGAAGTCAGCATTCAATGCTTTGCTG
K T M A E R D P V A A A Q K Y K P I Q
842 AAAACGATGGCCGAAAGGGATCCTGTTGCAGCAGCGGCACAAAAGTACAAACCAATTCAA
S A V P G T T L G P I Q I N A F V G G E
902 TCTGCTGTCCCTGGAACCACCTTGGGTCCAATTCAGATCAACGCTTTTCGTCGGAGGAGAG
K L Y D T P G V H L H H R Q A A V V H S
962 AAGTTGTATGACACACCGGGTGTGCACCTACACCACAGGCAAGCAGCTGTCGTTTATTCA
D D L P A L A P Q N R L R G Q S F D I S
1022 GATGATTTACCCGCCCTTGCTCCTCAAATCGTCTCAGAGGCCAATCTTTTCGATATTTCA
T L P T Q S S S S P K G E S L N G Y T F
1082 ACTTTGCCAACTCAATCGTCAAGTAGTCCCAAGGGTGAGAGCTTAAACGGTTATACATTT
F W G G L V R I D I L K V D I L Q A L P
1142 TTCTGGGGAGGTCTCGTTAGGATTGACATCTTGAAGGTTGACATATTGCAGGCTCTACCG
E T C F T F Y G P K A L E I H A V P T K
1202 GAAACATGTTTACATCTATGGACAAAAGCTCTTGAGATTCATGCAGTACCAACCAAAA
T A T A F Y E K E L G V L L
1262 ACAGCGACTGCCTTTTACGAGAAAGAACTGGGTGTGCTTCTAA

```

Figura 6) Seqüência do cDNA do gene *HHP* clonado por PCR. A seqüência da proteína deduzida está indicada sobre a seqüência de DNA.



HHP\_Seq  
NM\_180335 ATGGCGCTACGAACACTCTCAACGTTTCCTTCTCTTCCCTCGTCGCCACACAACGACGAGA  
ATGGCGCTACGAACACTCTCAACGTTTCCTTCTCTTCCCTCGTCGCCACACAACGACGAGA  
\*\*\*\*\*

HHP\_Seq  
NM\_180335 CGTGAACCCAATCTCACCGTCATTTACCGTAATCCGACGACATCAATCGTCTGTAAATCA  
CGTGAACCCAATCTCACCGTCATTTACCGTAATCCGACGACATCAATCGTCTGTAAATCA  
\*\*\*\*\*

HHP\_Seq  
NM\_180335 ATAGCTAATTCAGAACCACCAGTTTCACTCTCGGAACGAGATGGATTTGCGGGCGGCTGCT  
ATAGCTAATTCAGAACCACCAGTTTCACTCTCGGAACGAGATGGATTTGCGGGCGGCTGCT  
\*\*\*\*\*

HHP\_Seq  
NM\_180335 CCAACCCCTGGAGAAAGGTTCTCGGAGAACCAACGAGCTCATGAAGCTCAGAAAGTAGTG  
CCAACCCCTGGAGAAAGGTTCTCGGAGAACCAACGAGCTCATGAAGCTCAGAAAGTAGTG  
\*\*\*\*\*

HHP\_Seq  
NM\_180335 -----GAGATTATTGCACGGAAAGTT  
AAGAAAGAGATCAAAAAGGAGAAGAAGAAAAGAAAGAGGAGATTATTGCACGGAAAGTT  
\*\*\*\*\*

HHP\_Seq  
NM\_180335 GTTGATACCTCAGTCTCATGTTGTTACGGCTGCGGAGCTCCGTTACAACTTCCGACGTC  
GTTGATACCTCAGTCTCATGTTGTTACGGCTGCGGAGCTCCGTTACAACTTCCGACGTC  
\*\*\*\*\*

HHP\_Seq  
NM\_180335 GATTCTCCGGGATTTGTCGATTTGGTTACTTATGAATTGAAGAAG---CATCACCAGTTA  
GATTCTCCGGGATTTGTCGATTTGGTTACTTATGAATTGAAGAAGAAGCATCACCAGTTA  
\*\*\*\*\*

HHP\_Seq  
NM\_180335 AGAACTATGATATGTGGAAGATGTCAGCTATTGTCACATGGACATATGATTACAGCAGTT  
AGAACTATGATATGTGGAAGATGTCAGCTATTGTCACATGGACATATGATTACAGCAGTT  
\*\*\*\*\*

HHP\_Seq  
NM\_180335 GGTGGTAATGGAGGTTATCCAGGTGGGAAACAATTTGTATCAGCTGATGAACTTCGTGAG  
GGTGGTAATGGAGGTTATCCAGGTGGGAAACAATTTGTATCAGCTGATGAACTTCGTGAG  
\*\*\*\*\*

HHP\_Seq  
NM\_180335 AAACTTTCTCATTTACGCCATGAGAAAGCTTTGATTGTTAAATTGGTGGTTGATATAGTG  
AAACTTTCTCATTTACGCCATGAGAAAGCTTTGATTGTTAAATTGGT---TGATATAGTG  
\*\*\*\*\*

HHP\_Seq  
NM\_180335 GATTTTAATGGAAGCTTTTTAGCTCGTGTTTCGTGATTTAGTTGGAGCTAATCCGATTATA  
GATTTTAATGGAAGCTTTTTAGCTCGTGTTTCGTGATTTAGTTGGAGCTAATCCGATTATA  
\*\*\*\*\*

HHP\_Seq  
NM\_180335 CTGTTATAACTAAGATTGATCTTCTTCCAAAAGGAACGGATATGAATTGTATCGGGGAT  
CTGTTATAACTAAGATTGATCTTCTTCCAAAAGGAACGGATATGAATTGTATCGGGGAT  
\*\*\*\*\*

HHP\_Seq  
NM\_180335 TGGGTTGTGGAAGTGACCATGAGGAAAAGCTTAATGTCTTGAGTGTCCATCTCACAAGT  
TGGGTTGTGGAAGTGACCATGAGGAAAAGCTTAATGTCTTGAGTGTCCATCTCACAAGT  
\*\*\*\*\*

HHP\_Seq  
NM\_180335 TCAAAGTCCCTGGATGGAGTTAGCGGAGTTGCATCAGAGATCCAGAAGGAGAAAAGGG-  
TCAAAGTCCCTGGATGGAGTTAGCGGAGTTGCATCAGAGATCCAGAAGGAGAAAAGGGA  
\*\*\*\*\*

HHP\_Seq  
NM\_180335 -----TGCAGCTAACGTAGGGAAGTCAGCATTCAATGCTTTG  
CGAGATGCTACATTCTGGGTGCAGCTAACGTAGGGAAGTCAGCATTCAATGCTTTG  
\*\*\*\*\*

Figura 7 (continua na próxima página)

```

HHP_Seq          CTGAAAACGATGGCCGAAAGGGATCCTGTTGCAGCAGCGGCACAAAAGTACAAACCAATT
NM_180335        CTGAAAACGATGGCCGAAAGGGATCCTGTTGCAGCAGCGGCACAAAAGTACAAACCAATT
*****

HHP_Seq          CAATCTGCTGTCCTTGAACCACCTTGGGTCCAATTCAGATCAACGCTTTCGTCGGAGGA
NM_180335        CAATCTGCTGTCCTTGAACCACCTTGGGTCCAATTCAGATCAACGCTTTCGTCGGAGGA
*****

HHP_Seq          GAGAAGTTGTATGACACACCCGGGTGTGCACCTACACCACAGGCAAGCAGCTGTCGTTTCAT
NM_180335        GAGAAGTTGTATGACACACCCGGGTGTGCACCTACACCACAGGCAAGCAGCTGTCGTTTCAT
*****

HHP_Seq          TCAGATGATTTACCCGCCCTTGCTCCTCAAAATCGTCTCAGAGGCCAATCTTTCGATATT
NM_180335        TCAGATGATTTACCCGCCCTTGCTCCTCAAAATCGTCTCAGAGGCCAATCTTTCGATATT
*****

HHP_Seq          TCAACTTTGCCAACTCAATCGTCAAGTAGTCCCAAGGGTGAGAGCTTAAACGGTTATAACA
NM_180335        TCAACTTTGCCAACTCAATCGTCAAGTAGTCCCAAGGGTGAGAGCTTAAACGGTTATAACA
*****

HHP_Seq          TTTTCTGGGGAGGTCTCGTTAGGATTGACATCTTGAAGTTGACATATTGCAGGCTCTA
NM_180335        TTTTCTGGGGAGGTCTCGTTAGGATTGACATCTTGAAG-----CTCTA
*****

HHP_Seq          CCGGAAACATGTTTACATTCTATGGACCAAAGCTCTTGAGATTCATGCAGTACCAACC
NM_180335        CCGGAAACATGTTTACATTCTATGGACCAAAGCTCTTGAGATTCATGCAGTACCAACC
*****

HHP_Seq          AAAACAGCGACTGCCTTTTACGAGAAAGAACTGGGTGTGCTTCTAA-----
NM_180335        AAAACAGCGACTGCCTTTTACGAGAAAGAACTGGGTGTGCTTCTAAACACCTCCATCAGGG
*****

HHP_Seq          -----
NM_180335        AAAAAATCAGATGCAGGAGTGAAAGGGTTACAATCTCACCGGTTACTTCAAATCGAAATC

HHP_Seq          -----
NM_180335        AACGATGCAAAAAGACCGGCTAGTGATGTGGCAATATCAGGGTTAGGATGGATTTCAATT

HHP_Seq          -----
NM_180335        GAACCAATCCGCAAAACACGAGGAACTGAACCGAGAGATCTCAATGAAGCAGAGCATGAG

HHP_Seq          -----
NM_180335        ATACATATTTGTGTCAGTGTGCCAAAACAGTTGAAGTTTTTCTTCGACCAACATTGCCA

HHP_Seq          -----
NM_180335        ATTGGTACTTCAGGTAATGGTATCAGTATCGTGAGTTAACCGATAAGGAAGAAGAA

HHP_Seq          -----
NM_180335        GTAAGACCCAAATGGTACTTTTGA

```

Figura 7) Alinhamento da seqüência do cDNA do gene *HHP* clonado por PCR com a seqüência do cDNA descrita por Guo et al.(2003), número de acesso NM\_180335.

## 5.2) Localização subcelular da proteína HHP fusionada com GFP

Para a análise da localização subcelular da proteína HHP foi feita a construção pHHP\_GFP, na qual a proteína GFP está fusionada na região carboxi-terminal da proteína HHP. Essa construção foi transferida para epitélio de cebola via biobalística. Pela análise da Figura 8 A podemos observar o direcionamento para organelas. Também foi realizada uma co-transformação da construção pHHP\_GFP com uma segunda construção, contendo uma fusão com RFP (Proteína Florescente Vermelha) possuindo um peptídeo sinal para mitocôndria, (Schenk et al., 2004, Dietrich e Maiss, 2003, Nahalkova e Fatehi, 2003).

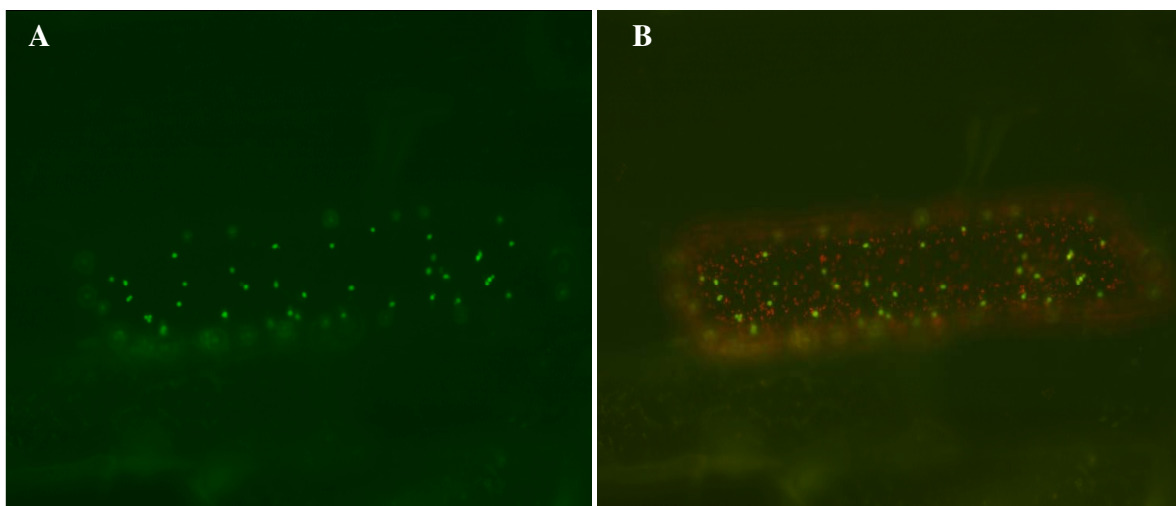


Figura 8) Localização subcelular da proteína HHP fusionada à GFP em epiderme de cebola. A construção pHHP\_GFP foi precipitada sobre partículas de ouro e introduzida em epitélio de cebola via biobalística. As células foram visualizadas em microscópio utilizando luz ultravioleta. (A) Fusão HHP:GFP, (B) Fusão HHP:GFP bombardeada juntamente com a fusão HHP:RFP.

Pela análise da Figura 8 B confirmou-se então o direcionamento da proteína para os plastídeos. Caso a localização fosse em mitocôndrias, haveria sobreposição com o sinal da RFP. Esse resultado veio a confirmar as análises *in*

*silico*, uma vez que o programa iPSORT (Bannai et al., 2001) identificou a região peptídeo sinal para plastídeos.

### **5.3) Análise da expressão do gene *HHP***

A primeira etapa na caracterização do gene *HHP* foi avaliar o seu padrão de expressão em diversas partes da planta. Os maiores níveis de expressão do gene são encontrados em folhas e em flores, sendo as menores expressões observadas em raiz, vagem verde e em semente quiescente (Figura 9).

As folhas e flores são órgãos que crescem e diferenciam de forma rápida em *arabidopsis*. Pode-se sugerir que provavelmente esse gene esteja envolvido com processo de diferenciação celular, como as possíveis isoformas de NOS descritas em tecidos foliares de milho e flores de café (Modolo et al., 2000). No entanto, não foi notada uma grande expressão desse gene em raízes de *arabidopsis*, apesar de se ter conhecimento sobre imunolocalização de uma provável isoforma NOS em ápices radiculares de plantas de milho (Ribeiro-Jr et al, 1999), e da alongação de ápices de raízes de milho tratadas com doadores do NO (Gouvêa et al., 1997).

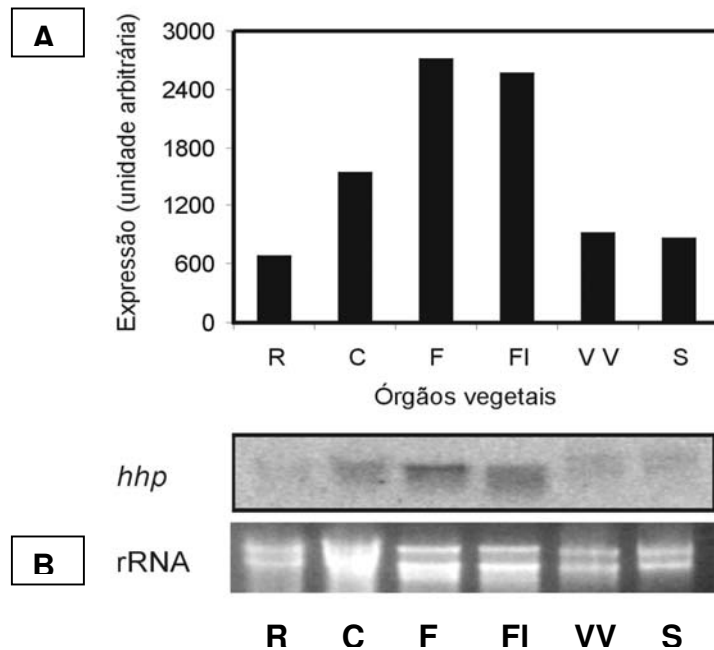


Figura 9) Expressão do gene *HHP* em diferentes partes da planta de *Arabidopsis*: raiz (R), caule (C), folha (F), flor (FI), Vagem Verde (VV) e semente (S). (A) Intensidade do sinal de expressão quantificado com o software Image Gauge (Fuji Foto Filme, Japão). (B) RNA-gel blot da expressão do gene *HHP*. O RNA total (rRNA) corado com brometo de etídeo é mostrado sob cada amostra.

A expressão do gene *HHP* em resposta ao frio também foi avaliada. Um claro aumento da expressão foi observado após 24 e 48 horas de exposição a 4 °C (Figura 10). Essa maior expressão do gene *HHP* indica que esse gene pode ter um papel protetor contra o frio. Vários genes conhecidos possuem esse comportamento, como por exemplo o gene *RD29A* e *COR15A* em plantas de *Arabidopsis* (Ishitani, et al., 1998), o gene de uma proteína desacopladora de mitocôndria (Maia et al., 1998), o gene *WAP27* em tecido parenquimatoso de amora (Ukaji, et al., 2001), e fatores de transcrição da família CBF que modulam a expressão gênica em resposta ao estresse, como os genes *Kin1* e *COR47* entre outros (Lee et al., 2002).

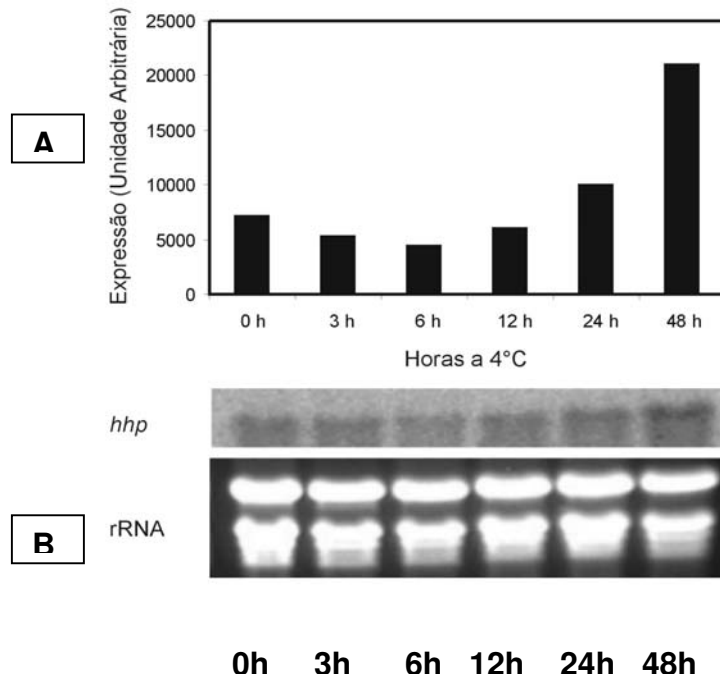


Figura 10) Expressão do gene *HHP* em plantas de *Arabidopsis* expostas ao frio (4 °C) por 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas. (A) Intensidade do sinal de expressão quantificado com o software Image Gauge (Fuji Foto Filme, Japão). (B) RNA-gel blot da expressão do gene *HHP*. O RNA total (rRNA) corado com brometo de etídeo é mostrado sob cada amostra.

#### 5.4) Caracterização do gene *HHP* em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*

A modificação genética aumentando ou reduzindo a expressão de um determinado gene permite inferir suas funções, em virtude das alterações observadas nas plantas transgênicas. Com esse intuito foram obtidas plantas que superexpressam o gene *HHP* e plantas nas quais a expressão foi silenciada pelo uso de uma construção antisenso.

#### 5.4.1) Obtenção de plantas transgênicas

As plantas transgênicas foram selecionadas pelo uso do gene de seleção NPT II, que confere resistência ao antibiótico canamicina. Dessa forma plantas transformadas que contenham e expressam o gene marcador em contato com o antibiótico crescem normalmente, enquanto as plantas não transformadas não se desenvolvem ou mesmo morrem.

Normalmente as plantas transformadas com *Agrobacterium tumefaciens* têm apenas uma cópia do transgene inserido no genoma. Nas análises dos efeitos fenotípicos em plantas transgênicas é aconselhável trabalhar com plantas homozigotas, para estimar o número correto de loci apresentando o gene inserido.

Plantas selecionadas na geração R0 foram autofecundadas e suas sementes (geração R1) germinadas em meio seletivo. As plantas R1 sobreviventes apresentavam heterozigose para a presença do transgene. Essas plantas foram novamente autofecundadas e suas sementes (geração R2) germinadas em meio seletivo. As plantas R2 heterozigotas produzem plântulas que segregam quanto à sensibilidade ou resistência ao antibiótico, enquanto que as plantas homozigotas produzem apenas plantas resistentes, sendo essas selecionadas para os demais estudos.

Podemos observar na figura 11 A a segregação de plantas sensíveis e resistentes a canamicina em meio MS de seleção. Na figura 11 B podemos observar plântulas não transformadas de arabisopsis em meio MS onde não são observados os sintomas de sensibilidade.

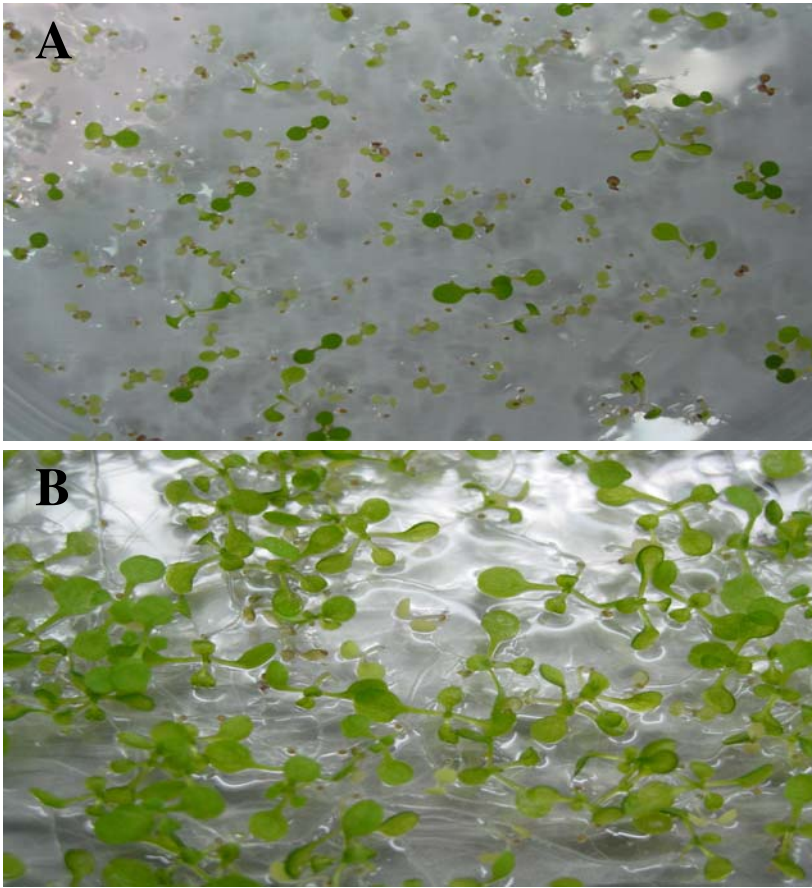


Figura 11) Seleção de plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*. (A) Plântulas transformadas e não transformadas em meio MS de seleção e (B) plântulas não transformadas em meio MS.

Um total de 16 clones contendo a construção pRTHHP e 13 contendo a construção pAntisense foram avaliados (Tabela 1). Os clones Sense 4, 5 e 9 e Antisense 2, 8, 13 e 15 foram selecionados por apresentarem apenas plantas resistentes, indicando homozigose dos transgenes.

É importante citar que a presença de plantas sensíveis em alguns casos não permite afirmar com 100% de certeza que se tratam de plantas homozigotas. No entanto, pelo teste de  $\chi^2$  essa possibilidade é de 99%.



<b>Clone</b>	<b>Sensíveis</b>	<b>Resistentes</b>	<b>Total</b>	<b>Segregação</b>
<b>Sense 1</b>	<b>12</b>	<b>28</b>	<b>40</b>	
<b>Sense 2</b>	<b>2</b>	<b>24</b>	<b>26</b>	
<b>Sense 3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	
<b>Sense 4</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>AA</b>
<b>Sense 5</b>	<b>0</b>	<b>40</b>	<b>40</b>	<b>AA</b>
<b>Sense 7</b>	<b>8</b>	<b>32</b>	<b>40</b>	
<b>Sense 9</b>	<b>2</b>	<b>90</b>	<b>92</b>	<b>AA</b>
<b>Sense 10</b>	<b>18</b>	<b>36</b>	<b>54</b>	
<b>Sense 11</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	
<b>Sense 12</b>	<b>8</b>	<b>18</b>	<b>26</b>	
<b>Sense 13</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	
<b>Sense 14</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	
<b>Sense 16</b>	<b>10</b>	<b>72</b>	<b>82</b>	
<b>Sense 17</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>18</b>	
<b>Sense 18</b>	<b>64</b>	<b>6</b>	<b>70</b>	
<b>Sense 19</b>	<b>6</b>	<b>26</b>	<b>32</b>	
<b>Asense 1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	
<b>Asense 2</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>AA</b>
<b>Asense 5</b>	<b>3</b>	<b>42</b>	<b>45</b>	
<b>Asense 6</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	
<b>Asense 7</b>	<b>5</b>	<b>22</b>	<b>27</b>	
<b>Asense 8</b>	<b>0</b>	<b>89</b>	<b>89</b>	<b>AA</b>
<b>Asense 9</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	
<b>Asense 10</b>	<b>2</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	
<b>Asense 12</b>	<b>7</b>	<b>26</b>	<b>33</b>	
<b>Asense 13</b>	<b>0</b>	<b>31</b>	<b>31</b>	<b>AA</b>
<b>Asense 14</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<b>Asense 15</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>AA</b>
<b>Asense 16</b>	<b>4</b>	<b>28</b>	<b>32</b>	

Tabela 1) Análise de segregação das plantas transformadas com as construções pRTHHP e pAntisense. Sementes da geração R2 que foram plaqueadas em meio MS de seleção e duas semanas após a germinação foram contadas as plantas resistentes a canamicina (apresentando fenótipos normais) e as plantas sensíveis (pouco desenvolvidas, amareladas ou mortas).

#### 5.4.2) Análise da expressão do gene *HHP* em plantas transgênicas

Com a finalidade de se monitorar a expressão do gene *HHP* nas plantas transgênicas produzidas, decidiu-se realizar *northern blot* a partir de RNA total extraído da parte aérea dos clones obtidos, como mostrado abaixo:

Aproximadamente 10 µg de RNA total de folhas de plantas foram submetidas em corrida eletroforética e transferidas para membranas de náilon, que foi hibridada com a sonda que codifica o gene *HHP*. Plantas dos clones 35s:Hhpantisense:3'35s 2, 8, 13 e 15 apresentaram uma expressão muito menor do gene *HHP* quando comparadas com plantas de *arabidopsis* selvagens (Figura 12). Os clones 4, 9 e 16 transformados com o cassete 35s:Hhp:3'35S mostraram níveis mais elevados de expressão do gene *HHP* quando comparados com plantas selvagens (Figura 12).

Dessa forma constatamos que a construção 35s:Hhpantisense:3'35s silenciou o gene *HHP* e que a construção 35s pHhp 3'35s superexpressou o gene *HHP*.

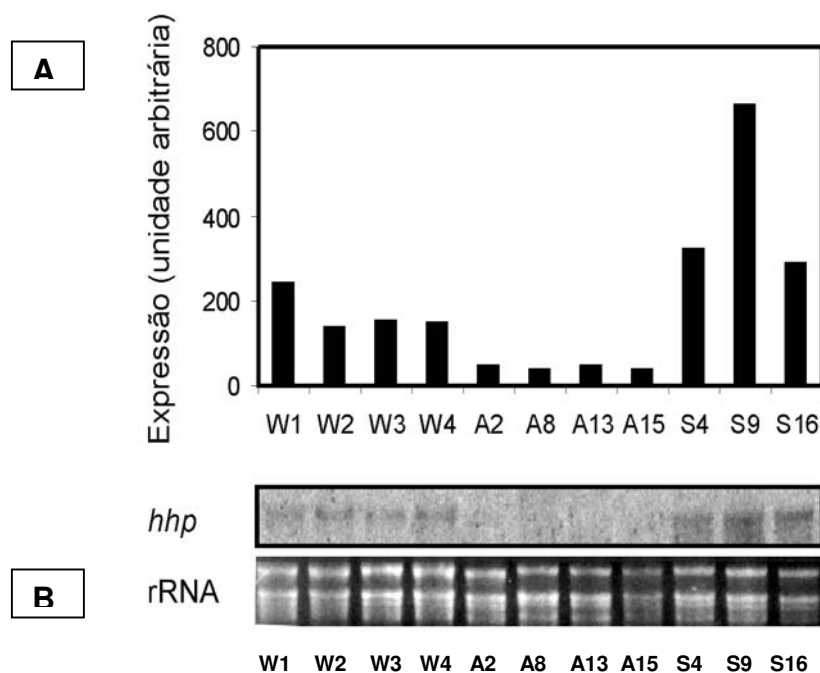


Figura 12) Expressão do gene *HHP* em plantas selvagens (W1, W2 W3 e W4), antisense (A2, A8, A13 e A15) e de superexpressão (S4, S9 e S16). (A) Intensidade do sinal de expressão quantificado com o software Image Gauge (Fuji Foto Filme, Japão). (B) RNA-gel blot da expressão do gene *HHP*. O RNA total (rRNA) corado com brometo de etídeo é mostrado sob cada amostra.

#### 5.4.3) Resposta dos clones HHP ao frio

Para avaliar o papel protetor do gene *HHP* contra o estresse causado por frio, sementes dos clones Sense 4 e 9, Asense 2, 8 e 13, foram plaqueadas em meio seletivo. Após 28 dias as plantas foram transferidas para solo, onde permaneceram por 15 dias. Plantas selvagens foram plaqueadas em meio MS e repicadas da mesma forma que os clones. Após o período de adaptação à repicagem para solo, as plantas foram submetidas ao tratamento por frio que consistiu em se colocar as plantas por 10 dias a 4 °C em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Ao final do tratamento foi observado que as plantas selvagens possuíam sintomas característicos da ação do frio, como folhas enroladas e pequenas áreas de necroses nos limbos foliares (Figura 13). Os clones asense mostraram um grau de injúria ao frio maior, sendo observadas grandes áreas de necroses nos limbos foliares e uma acentuada murcha da planta (Figura 13). Quando transferidas para condições normais de temperatura, tanto as plantas selvagens como asense não sobreviveram (dados não mostrados). Já os clones Sense não sofreram necrose devido ao frio, apresentando inclusive órgãos reprodutivos, não observados nas demais plantas estudadas (Figura 13). As plantas Sense apresentaram desenvolvimento normal após a transferência para temperatura normal de cultivo.

Esses resultados demonstram que o gene *HHP* superexpresso confere uma maior tolerância a baixas temperaturas em plantas de arabis, e que a deficiência de transcritos *HHP* resulta em uma menor tolerância ao frio.

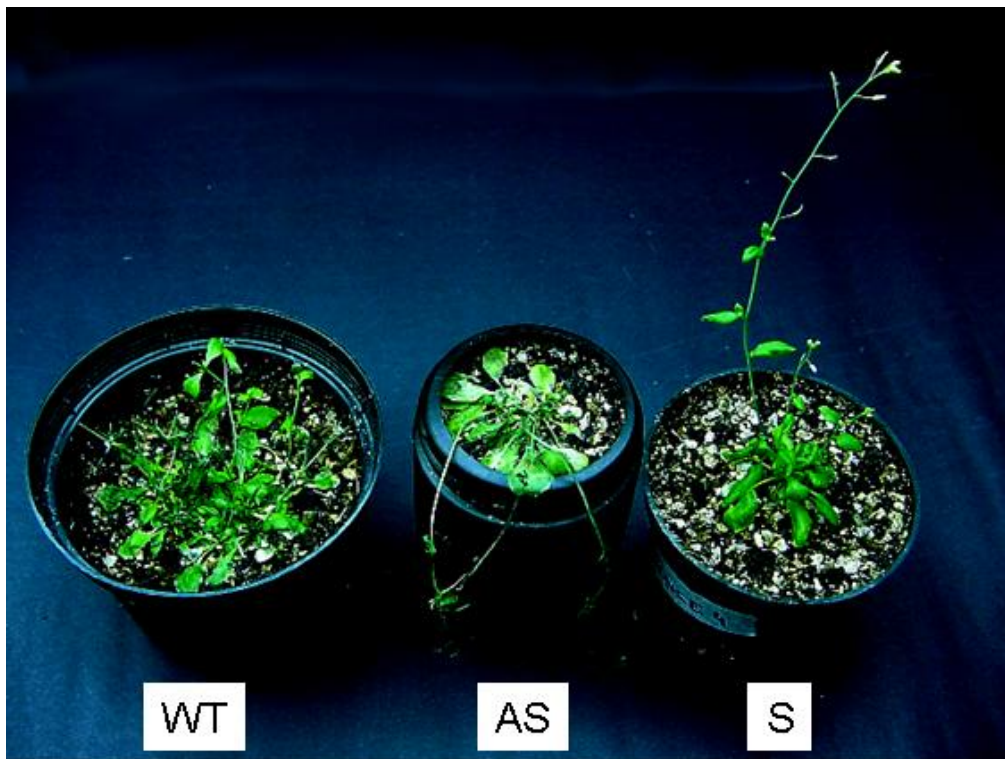


Figura 13) Expressão do gene *HHP* na resposta a baixas temperaturas. Plantas selvagens (WT), expressando o gene *HHP* antisense (AS) e senso (S) foram mantidas por 10 dias a 4°C.

### 5.5) Análise da expressão do promotor *HHP*

A atividade GUS foi avaliada em cinco plantas (denominadas pHHPGUS), geração R1, oriundas de um mesmo evento de transformação. Porém não houve visualização da atividade GUS nas plantas analisadas (Figura 15). As plantas usadas como controle positivo, transformadas com a construção pBi121 apresentaram forte coloração azul, como esperado. Testes posteriores deveriam ser repetidos em novos eventos de transformação dessas plantas a fim de se tentar visualizar uma possível ação do promotor *HHP* em algum(s) dos órgãos de *Arabidopsis*.

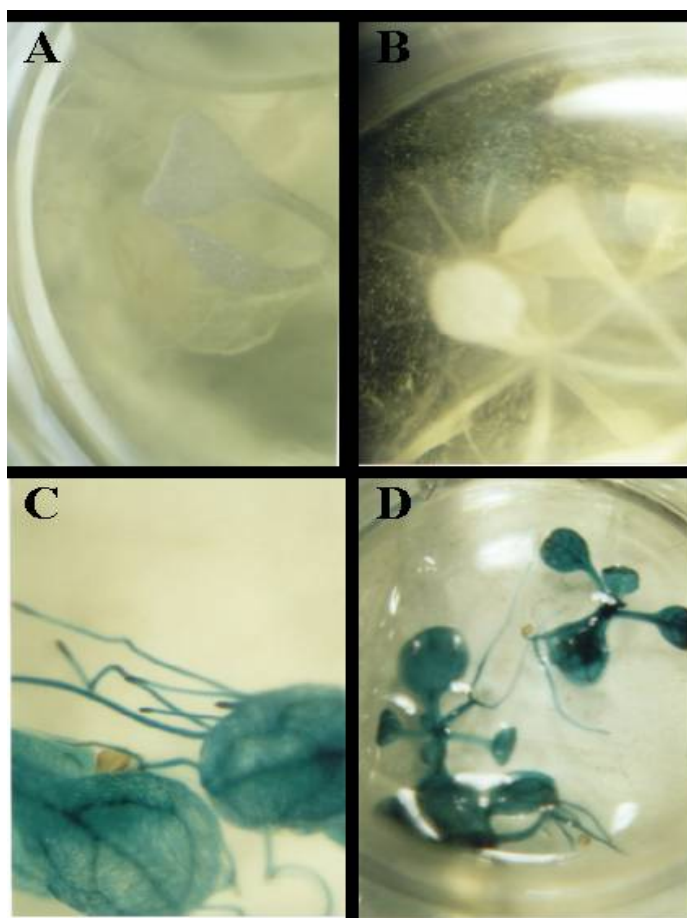


Figura 14) Atividade GUS em plantas de *Arabidopsis*. Plantas de *Arabidopsis* transformadas com a construção pHPGUS (A e B) e com a construção pBi121 (C e D) foram incubadas com o substrato X-Gluc a 37°C durante 24 h. A coloração azul indica atividade da beta-glucuronidase.

## **5.6) Análise da expressão gênica em células de cana de açúcar em resposta a doadores de NO**

O NO está envolvido em diversos aspectos do desenvolvimento vegetal, como na interação planta-patógeno (Delledone, et al., 1998, Durner et al., 1998, Bolwell, 1999, Macdowell, Dangl, 2000, Modolo et al., 2002), na expansão foliar e redução da velocidade de amadurecimento ou senescência de frutos e flores (Leshem e Hamarat, 1996, Leshem et al., 1998), ou ainda por sinalizar mudanças no controle da abertura e fechamento estomático (Neil et al, 2002, Garcia-Mata, et al., 2003, Guo et al., 2003).

Na compreensão sobre o mecanismo de ação do NO a identificação de alterações na expressão gênica tem um importante papel estratégico. Para tanto, as plantas são expostas ao NO ou a doadores de NO. Dessa forma alguns genes modulados pelo NO foram identificados, como o que codifica a fenil alanina amônia liase de *A. thaliana* (Delledone et al., 1998) e o que codifica a aconitase em *Nicotiana tabacum* (Navarre, et al., 2000). Recentemente, Huang et al. (2002) realizaram um experimento em larga escala empregando microarrays para avaliar perfis de expressão em *A. thaliana* expostas a NOR-3, um doador de NO. Dentre os vários genes identificados, os autores destacam aqueles que codificam enzimas envolvidas na detoxificação de radicais livres (cuja produção é induzida pelo NO), entre os quais encontra-se uma oxidase alternativa (OXA) tolerante ao NO.

Considerando a relevância econômica da cana-de-açúcar e a total ausência de estudos sobre a ação do NO nessa cultura, decidimos realizar ensaios de expressão gênica em larga escala, utilizando células em cultura expostas ao doador GSNO (S-nitrosoglutathione).

### **5.6.1) Liberação de NO pelo GSNO**

Em uma primeira etapa, foi avaliada a liberação de NO pelo GSNO em solução aquosa. A figura 15 mostra a cinética da curva de liberação do NO de

acordo com a decomposição térmica do GSNO aquoso administrado nas subculturas de células a 25°C. A concentração de 5 mM L<sup>-1</sup> possui uma taxa constante de liberação do NO de 1,15 μmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> até o período de 6 horas no escuro (Figura 15).

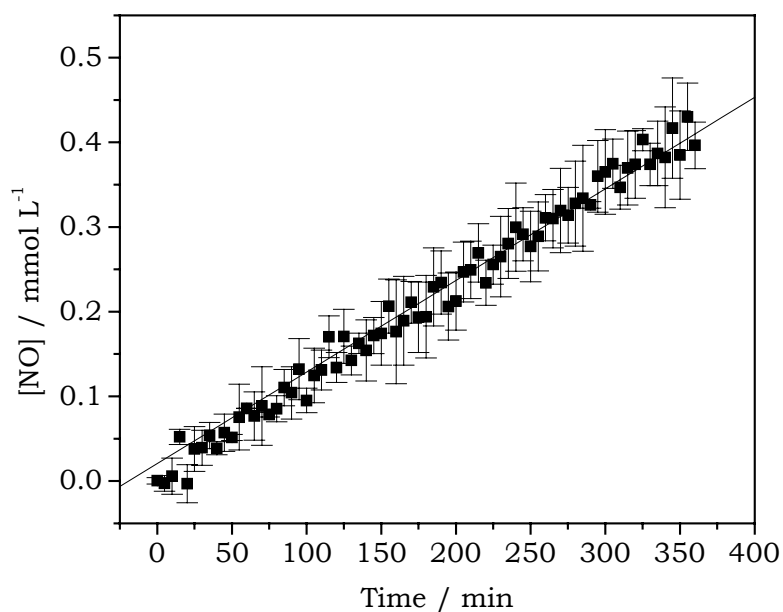


Figura 15) Taxa de liberação de NO pela decomposição do GSNO em meio aquoso. GSNO na concentração inicial de 5 mM foi adicionado ao meio de cultura e a liberação de NO foi monitorada até 360 minutos.

### 5.6.2) Construção dos macroarranjos de ESTs de cana de açúcar

A partir das bibliotecas do projeto SUCEST foram construídos arranjos em membranas de náilon contendo 3840 e 2304 genes aleatórios de folha e raiz, respectivamente. Os arranjos foram feitos com o uso de um robô QBOT (Genetix, USA), em conjuntos de 8 membranas réplicas. A quantidade de DNA fixado nas membranas foi determinada pela hibridação das membranas com a sonda overgo (descrita em material e métodos). Após a quantificação dos sinais radiativos obtidos para cada spot nessa hibridação, a média destes valores foi calculada para cada membrana e os genes que apresentaram algum spot com sinal inferior

a 10% desta média foram excluídos das análises posteriores. Genes que apresentaram, uma variação de mais de duas vezes entre os sinais dos respectivos spots réplicas em alguma das membranas foram também descartados das análises subseqüentes. Em torno de 66,6% do total de genes foram aprovados nestes critérios, indicando que a variação na quantidade de DNA fixado nas membranas foi pequena.

### 5.6.3) Hibridação dos macroarranjos

As culturas celulares de cana-de-açúcar foram divididas em 24 erlenmeyers contendo 50 mL de cultura. Após uma semana o doador de NO (GSNO) foi adicionado de forma a obter concentrações finais de 0,1 mM; 1,0 mM e 5,0 mM. Após 30 minutos e 6 horas as células foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido sem a presença do meio de cultura. O experimento foi montado em triplicata.

A partir do RNA total de cada amostra foram produzidas sondas de cDNA na presença  $\alpha$ -dCTP[<sup>33</sup>P] (vide Material e Métodos). Os sinais radioativos emitidos por cada spot foram quantificados com o software ArrayVision™ (Imaging Research, Canada). A emissão de fundo (*background*) foi calculada em torno de cada spot, e os valores obtidos foram subtraídos dos sinais encontrados nos spots. Em cada membrana esses valores subtraídos dos respectivos *backgrounds* foram então normalizados, dividindo-os pela mediana dos próprios (baseando-se na suposição que a maioria dos genes não apresenta grandes alterações na sua expressão e portanto essa mediana deve se manter estável nas hibridações, a menos de flutuações indesejáveis inerentes ao método). Esses valores normalizados são denominados nVol.

Em seguida os sinais obtidos para cada gene foram submetidos a alguns critérios de qualidade, associando-se a cada gene um código numérico a cada hibridação. Estes testes visam evitar conclusões equivocadas devido a artefatos causados por sinais fracos. Os genes foram marcados quanto a:

- Presença de algum spot com nVol igual a zero



- Presença de algum spot com sinal (não normalizado) menor que 10% do respectivo background
- Variação maior que duas vezes entre os sinais dos spots réplicas, numa mesma hibridação.

Os genes que não passaram em algum dos testes não foram excluídos imediatamente das análises, mas ficaram marcados para avaliação posterior.

Para identificar os genes diferencialmente expressos em resposta a presença de NO, diferentes estratégias de análise foram adotadas em paralelo:

- Cada tratamento foi comparado com seu controle (0 mM de GSNO) utilizando-se o algoritmo ISER (<https://ipe.cbmeg.unicamp.br>, Drummond et al, manuscrito em preparação). Como os experimentos foram feitos em duplicata, os genes selecionados como diferencialmente expressos foram aqueles que o algoritmo destacou em ambas as repetições.

- Agrupando as duas replicatas do experimento, a cada comparação entre tratado e controle (0 mM de GSNO) tinha-se para cada gene quatro valores de nVol provenientes do tratado (dois spots por replicata) e quatro do controle. Após calcular os logaritmos desses valores, que se supõem ter distribuição mais próxima da normal, aplicou-se um teste T de Student pareado a cada gene, para assim identificar aqueles em que os logaritmos dos nVol são significativamente diferentes ( $p\text{-valor} < 0,01$ ) entre tratado e controle.

- Um algoritmo baseado em permutações dos dados para ajustar os p-valores, de Westfall e Young (Dudoit et al, 2000), foi aplicado ao conjunto total de dados dos experimentos, a cada comparação tratado x controle. Os genes selecionados como diferencialmente expressos foram aqueles com p valor ajustado menor que 0,1.

- Um algoritmo de *Self-Organizing Maps* (Tamayo et al., 1999) foi aplicado ao conjunto de genes que haviam sido selecionados em ao menos um dos testes acima. Dentre os grupos formados, selecionou-se por inspeção visual aqueles que apresentavam mais claramente um perfil de indução ou repressão em resposta à presença de NO.

Por fim, selecionaram-se para cada tratamento (0,1, 1 e 5 mM) os genes que:

- Foram destacados pelo algoritmo ISER em ambas as repetições do experimento, ou
- Foram destacados pelo ISER em uma repetição e foram selecionados pelo teste t de Student, ou
- Foram selecionados pelos testes de permutações (que são mais restritivos)
- Após realizarmos o *Self-Organizing Map* obtivemos uma seleção final de genes que:
- De acordo com seu código numérico não tinham apresentado spot com sinal igual a zero ou variação de mais de duas vezes entre sinais de spots réplicas em mais de uma hibridação e
- Pertenciam às seleções acima para os três tratamentos, ou
- Pertenciam às seleções acima para dois tratamentos e foram selecionados com o *Self-Organizing Map*.

Desta última seleção constaram 15 genes, listados a seguir.

#### **5.6.4) Caracterização dos genes modulados por NO**

Quinze ESTs de cana de açúcar foram induzidos nas membranas estudadas sendo seis ESTs de raiz e sete ESTs de folha, além de dois ESTs reprimidos em raiz (Tabela 2 e Figura 16).

Perfil Expressão	Nome do Clone	Descrição do Clone	Função
Induzido - Raiz	SCEZRT2023D12.g	No Match	Desconhecida
Induzido - Raiz	SCEZRT2024A10.g	Peroxidase	Estresse Oxidativo
Induzido - Raiz	SCEZRT2024B11.g	Aminotransferase	Metabolismo de Nitrogênio
Induzido - Raiz	SCQSRT2036G04.g	Proteína Hipotética F16J13.150	Desconhecida
Induzido - Raiz	SCAGRT2037H11.g	Proteína Hipotética	Desconhecida
Induzido - Raiz	SCEZRT2023F09.g	No Hits	Desconhecida
Reprimido - Raiz	SCQSRT2031H10.g	Proteína Hipotética MCR8.17	Desconhecida
Reprimido - Raiz	SCAGRT2039A06.g	CKC	Fator de Transcrição
Induzido - Folha	SCBGLR1003A06.g	No Hits	Desconhecida
Induzido - Folha	SCSGLR1084D06.g	No Hits	Desconhecida
Induzido - Folha	SCQGLR1085F03.g	No Hits	Desconhecida
Induzido - Folha	SCACLR1130H09.g	No Hits	Desconhecida
Induzido - Folha	SCROLLV1024F09.g	Proteína Hipotética T4L20.110	Desconhecida
Induzido - Folha	SCROLLV1028D05.g	No Hits	Desconhecida
Induzido - Folha	SCBGLR1120G12.g	Histona H1	Expressão Gênica

Tabela 2) Genes induzidos e reprimidos de cana de açúcar pela presença de doadores de NO.

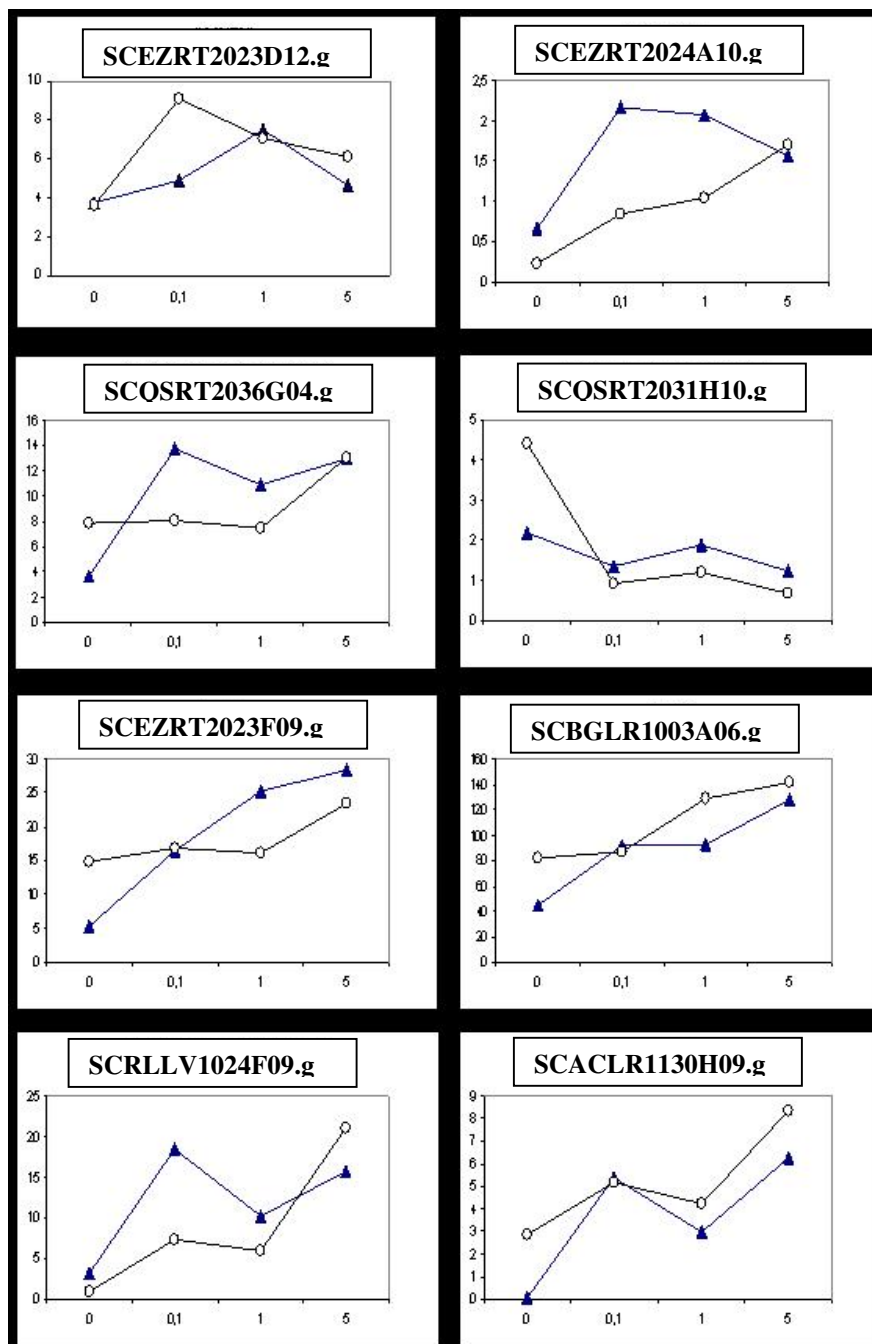


Figura 16) Perfil de expressão de genes induzidos e reprimidos de cana de açúcar pela presença de doadores de NO. As células de cana-de-açúcar foram cultivadas em meio contendo 0-5 mM de doador de óxido nítrico (GSNO), conforme indicado no eixo X. Dois experimentos independentes foram realizados (indicados por triângulos e círculos). A intensidade da expressão gênica, em unidades arbitrárias, é indicada no eixo Y. A provável função de cada gene é indicada na tabela 2, o nome do clone está sobre cada gráfico.

Dentre os genes identificados podemos observar um aumento significativo na expressão de uma peroxidase em tecidos de raiz. As peroxidases formam uma família de enzimas composta por 3 classes encontradas em todas as plantas caracterizada pela presença de um grupo heme e por possuir também em sua estrutura glicoproteínas monoméricas (Kaothien et al., 2002). Sua atividade consiste em formar  $H_2O_2$  a partir de NADH e  $O_2$  sendo inicialmente detectada sua atividade pela redução de alcoóis aromáticos na polimerização de lignina em parede celular de plantas (Mader e Amberg-Fisher, 1982).

Outro gene de raiz induzido de forma significativa pela ação dos doadores de NO foi o que codifica uma aminotransferase (Figura 17). Essa enzima possui grande importância no metabolismo vegetal por realizar reações reversíveis de transaminação, produzindo vários compostos de nitrogênio. (Giovanelli, 1980). Alguns compostos oriundos de ação das aminotransferases são os aminoácidos aspartato, glutamato, alanina, serina e glicina entre outros. No entanto, ainda não foi caracterizada a influência do NO no metabolismo dos aminoácidos, que pode influenciar na quantidade de substrato disponível para as NOS de plantas. A L-arginina substrato das NOS é utilizada normalmente para a produção de ornitina, que em condições de estresse possui sua biossíntese estimulada, tornando-se dessa forma um grande competidor das NOS pelo substrato. Como as aminotransferases atuam na produção do aminoácido arginina, um aumento na expressão da enzima pode gerar um aumento indireto na biossíntese desse aminoácido. Com isso poderia haver uma redução na competição entre duas rotas metabólicas, interferindo na disponibilidade do mesmo substrato.

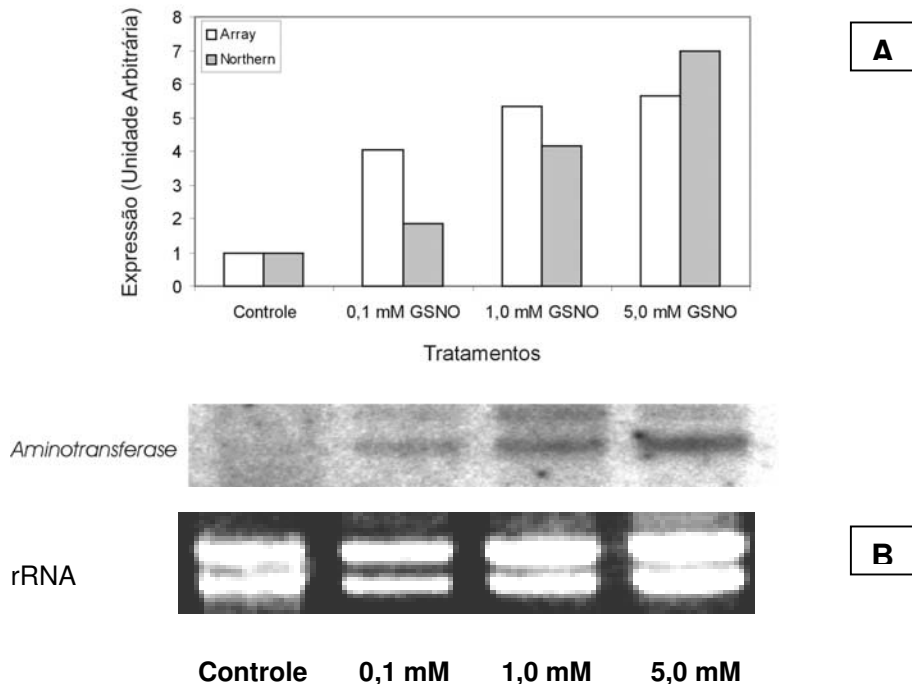


Figura 17) Expressão do gene que codifica aminotransferase em resposta a doadores de NO. (A) Quantificação da expressão gênica em *northern blot* (barras cheias) e em macroarranjos (barras vazias). (B) RNA-gel blot da expressão do gene *HHP* quantificada em (A). O RNA total (rRNA) corado com brometo de etídeo é mostrado sob cada amostra.

Podemos ainda observar que o fator transcrição CKC foi reprimido em tecidos de raiz quando as células de cana de açúcar foram expostas ao NO. Isso sugere que o NO possa regular a indução de algumas rotas metabólicas pela inibição desse fator de transcrição. Os demais genes induzidos e reprimidos caracterizados nesse trabalho não possuem descrição da influência direta ou indireta do NO ou das NOS de plantas conhecidas até agora.

Surpreendentemente, boa parte desses genes ainda não possuem função conhecida (No hits) ou são genes que podem expressar proteínas ainda não caracterizadas (Putative Protein). Com a finalidade de se conhecer melhor quais os possíveis papéis desempenhados por essas proteínas realizou-se uma análise de domínios no *Conserved Domain Database and Search Service* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os resultados estão descritos na Tabela 3.

Perfil Expressão	Nome do Clone	Domínio	Função
Induzido - Raiz	SCQSRT2036G04.g	PF02178	DNA binding motif A/T rich regions
Induzido - Raiz	SCAGRT2037H11.g	PF01704	UTP-Glucose –1-phosphate urydyltransferase
Induzido - Folha	SCRLLV1024F09.g	PF00010	Fator de transcrição de eucariotos bHLH

Tabela 3) Análise *in silico* de genes induzidos em cana de açúcar pela presença de doadores de NO quanto a sua função.

Pela análise dos resultados oriundos do pfam podemos observar que provavelmente os clones SCQSRT2036G04.g e SCRLLV1024F09.g possuem regiões conservadas com fatores de transcrição ricas em A/T e da família bHLH respectivamente. Ainda podemos observar que esses possíveis fatores de transcrição foram induzidos em tecidos de raiz e folha respectivamente. Em mamíferos o NO estimula a expressão gênica quando atua como mensageiro secundário, embora os relatos em plantas sejam escassos (Huang et al., 2002 e Delledone et al., 2003). Assim, torna-se de grande importância um melhor estudo e caracterização desses fatores de transcrição em plantas, a fim de se averiguar quais genes ou rotas metabólicas podem ser estimulados pela indução desses genes.

O gene *SCAGRT2037H11.g* possui um domínio característico de UTP-glicose-1-fosfato uridililtransferases, enzimas envolvidas com o metabolismo de carbono produzindo UDP-Glicose. Esse composto possui grande importância na re-locação e transporte de reservas fotossintéticas e na deposição de compostos de parede celular (Salisbury e Ross 1992).

## 6) DISCUSSÃO

O NO é considerado hoje uma molécula versátil devido a sua atuação na sinalização celular, seja em tecidos animais ou vegetais, manipulando vários processos fisiológicos como a vasodilatação, o relaxamento do músculo liso, a inibição da adesão plaquetária, a comunicação neuronal ou ainda por sua ação na regulação imune de mamíferos (Wendehenne et al. 2001). Em plantas são descritas ações do NO na resposta ao ataque fitopatógenos (Delledone et al., 1998, Modolo et al., 2002), na produção de fitoalexinas (Notritake et al., 1995), no aumento da atividade de GMPc e ADPRc (Pfeiffer, 1994, Giba 1998, Durner et al., 1998), na expressão de genes de defesa em tabaco (Delledone et al., 1995, Durner et al., 1998), na regulação da maturação e senescência de frutos em plantas (Leshem et al., 1998), no monitoramento da abertura e fechamento estomático (Garcia-Mata e Lamattina, 2001, Neill et al., 2002, Garcia-Mata et al., 2003), no processo de apoptose (Magalhães et al., 1999, Pedroso et al., 2000, Clarke, et al., 2000, Garcês et al., 2001, Beligni, et al., 2002) entre outros. No entanto todas as evidências da existência de uma isoforma NOS citadas acima foram somente confirmadas recentemente com a clonagem e caracterização de duas isoformas NOS (Chandok et al., 2003, Guo et al., 2003) e também demonstrado no presente trabalho.

Nossos dados mostram, pela primeira vez, que a expressão do gene *HHP* interfere na resposta ao frio em plantas de *A. thaliana*. Plantas silenciadas para este gene não toleraram o estresse, ao contrário de plantas que superexpressaram o gene NOS clonado, que não apresentaram qualquer sintoma de injúria ao estresse. Esse tipo de proteção em plantas transgênicas já foi demonstrada com outros genes, como por exemplo pela superexpressão do complexo I de mitocôndrias em plantas de *A. thaliana* (Lee et al., 2002) ou do fator de transcrição CBF3 (Gilmour et al., 2000). Este último promoveu uma alteração na composição de açúcares e aumentou o conteúdo de prolina em plantas de *A. thaliana*, além de influenciar a expressão de genes efetivamente envolvidos na resposta ao frio. Uma outra evidência do importante papel do gene *HHP* em



resposta ao frio é demonstrada pelo aumento da sua expressão em plantas expostas por 24 e 48 a 4 °C.

A provável localização subcelular das NOS de plantas já foi descrita como citoplasmática em células de raízes de milho (Ribeiro Jr et al, 1999) e em peroxissomos e cloroplastos de folhas de ervilha (Barroso et al., 1999). Nesses trabalhos foram utilizados anticorpos fluorescentes específicos para NOS de mamíferos, sendo relatadas marcações de prováveis isoformas NOS na matriz de peroxissomos e de cloroplastídeos. Os resultados apresentados neste trabalho com a fusão da proteína HHP com a GFP mostram que a NOS de *A. thaliana* tem uma localização em plastídeos, confirmando a predição *in silico* baseada na seqüência da proteína.

Um importante papel do NO como mensageiro secundário e sinalizador celular, seja ele produzido enzimaticamente ou não, é o seu efeito na expressão gênica (Delledone et al., 1998, Durner et al., 1998, Navarre, et al., 2000, Clark et al., 2000, Wendehenne et al. 2001, Huang et al., 2002, Delledone et al., 2003). No presente trabalho também foi observada alteração na expressão de diversos genes de cana de açúcar em resposta a doadores de NO. A regulação de um gene que codifica uma amino-transferase abre a possibilidade de que o NO possa atuar no controle da sua própria síntese. Cabe destacar que durante os estudos com macroarranjos foi otimizado o tipo de plástico que deve ser usado para selar as membranas. Plásticos com maior transmitância têm um claro impacto positivo no número de genes que pode ser avaliado.

Em suma, os dados de nossos estudos estão de acordo com a proposta atual sobre as possíveis funções do NO no reino vegetal. Cabe destacar que a sinalização de uma resposta a um novo estresse, causado pelo frio, constitui uma descoberta relevante, considerando a sua importância para diversas culturas ao redor do mundo.

## 7. Artigo:

### **Evaluation of the performance of different plastics used to seal nylon cDNA arrays.**

Antonio Paulino da Costa Netto<sup>1,2a</sup>, Rodrigo Duarte Drummond<sup>1,3a</sup>, Juliana de Maria Felix<sup>1,3</sup>, Renato Atílio Jorge<sup>4</sup>, Marcelo Menossi<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (UNICAMP), SP, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

<sup>a</sup>Both authors contributed equally to this work.

Short running title: Effects of sealing plastics on nylon cDNA arrays

Keywords: signal detection, nylon arrays, sensitivity

cDNA arrays technology is the main strategy for assessing gene expression profiles on a large scale. In this technique, cDNA clones corresponding to the genes under study are arrayed on a solid support, such as glass or nylon, and are then hybridized with labeled probes obtained from the samples under study. The amount of labeled probe bound to the cDNAs on the arrays is proportional to the number of mRNA molecules present in the initial population of cells. Because each array contains thousands of genes, the expression profile of a relevant part of the cell transcriptome can be easily assessed. cDNA arrays based on glass slides (microarrays) are by far the most common way to study gene expression on a large scale, whereas cDNA arrays on nylon filters (macroarrays) are an alternative to glass slides. Although the latter accommodate a lower number of genes, they are cheaper and more robust since they are based on the hybridization of radiolabeled probes to filters, a routine procedure in most molecular biology laboratories. Using macroarrays, we have successfully identified several genes that are induced by cold stress in sugarcane (1), and several recent studies on gene expression profiling have also used macroarrays, including the identification of angiogenesis factors in lung cancer tissues (2), the response to sulfur starvation in *Arabidopsis thaliana* plants (3), and the identification of genes involved in ceramide-dependent neuronal apoptosis (4).

One of the key difficulties in cDNA array analysis is the detection of genes that are expressed at low levels, particularly since these correspond to the largest part of the transcriptome in most cells (5, 6). Thus, finding ways to increase the signal detection is of great importance, since the higher the signals the greater the reliability of the measurements.

Nylon cDNA arrays have the advantage that they can be reused several times, in the same way as Southern and northern blots. We have reused nylon arrays up to seven times without noticeable loss of the signal (our unpublished results). It is needed to seal the membranes to avoid drying, what can lead to the covalent linking of immobilized probes on the array to the radioactive target probes. Since little attention has been paid to the type of plastic used to seal the nylon filters, we have compared several plastics to determine which one provides the best transmittance and evaluated their effect on the detection of gene expression and on other aspects of cDNA array analysis.

Five different plastics were compared: polyvinyl chloride (PVC, 13  $\mu\text{m}$  thick, *MajiPack*<sup>TM</sup>, Inproco, Brazil), polyvinylidene chloride (PVDC, 13  $\mu\text{m}$  thick, *Saran Wrap*<sup>TM</sup>, Johnson & Son, USA) and three polyethylene plastics of different thicknesses: 69, 29 and 7  $\mu\text{m}$  (PE-69, PE-29 and PE-7, Garoa, Brazil). Nylon arrays containing sugarcane ESTs obtained from the SUCEST library (7) were hybridized with <sup>33</sup>P-labelled cDNA from 30  $\mu\text{g}$  of total RNA, essentially as described in (1). Four nylon filters sealed with each plastic, and four replica filters which were not sealed, were exposed for 96 h in imaging plates (FLA3000-G, Fuji Photo Film, Japan). The radioactive intensity of each spot from the digitalized images was converted to relative intensity and quantified using the *Arrayvision*<sup>TM</sup> software (Imaging Research, Canada). The local background was subtracted from relative intensity of each spot and the intensity data were rearranged into MS Excel (Microsoft, USA) files for further analysis.

Three parameters were used to evaluate the interference of each type of plastic on the gene expression signal detected: the total radiation on each membrane (i.e., the sum of the intensities of all spots), the number of spots that showed a signal at least 10% higher than the local background emission (around the spot) and the number of genes for which the corresponding pair of replicate spots showed signals which varied in intensity by less than two fold. For each parameter, the data for each type of plastic and from naked nylon arrays were compared in pairs. To avoid assumptions regarding the distribution of the data, statistical comparisons were done using the Wilcoxon-Mann-Whitney rank sum test (8), a nonparametric test for two independent samples.

Initially, the effects of three different plastics (PE-69, PVC and PVDC) were compared to naked membranes (NM group). Nylon membranes that had previously been exposed without plastic were wrapped in the three types of plastic and the signals were then measured again. The set of naked membranes was exposed twice without wrapping in plastic, in order to control for the loss of signal due to radioisotope decay. The PE-69 plastic, routinely used by our group, had a strong blocking effect, with only 31.3% of the original emission from naked membranes being detected (Figure 2). PVC and PVDC showed less blocking, with 70.9% and 75.5% of the emission being detected. The latter values were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than those observed with PE-69, but were not significantly different from naked membranes.

One of the main problems with the decreased signal caused by the interference of plastics is that genes with low levels of expression are not detected. Since several regulatory genes are expressed at low levels, this must be minimized. The number of detected spots with signal at least 10% higher than the local background was used as a parameter to assess this effect. This percentage is usually used as a cut-off value in cDNA array experiments, with only signals above this level being considered as gene expression analysis. Compared to the naked membranes, there was a very similar number of detected spots when using PVC and PVDC (97.5% and 98.9%, respectively; Figure 2). The lowest detection was observed with PE-69 (92.3%). In a typical assay, with 3000 genes, the difference between PE-69 and PVDC would represent a loss of 198 genes, which is high. The largest difference in the number of detected spots (between PE-69 and NM) was 7.7%, much lower than the difference between the total emission (68.7%; Figure 2).

In cDNA array experiments, each gene is usually spotted twice in the same array. Random fluctuations during spotting can affect the amount of DNA in each spot. Although in glass arrays these fluctuations are not a problem (a control target is usually also hybridized with the test target), in nylon arrays, which are hybridized with only one target, these fluctuations may result in false positives, i.e. genes that are not up-regulated, but give higher signals in one array because of different amounts of DNA (the same is true for false negatives). To avoid this type of fluctuation in nylon arrays experiments, it is usual to eliminate from subsequent analysis all genes whose signals from different spots on the same membrane vary more than two fold (9). Since the shielding effect of sealing plastics decreases the signal intensities, it also increases data variability, causing more spots to be discarded by this criterion. To evaluate this effect, we analyzed the differences in

the number of genes discarded by this criterion in nylon filters wrapped in different sealing plastics. The percentage of accepted genes in the nylon arrays sealed with PVC and PVDC were only 2% lower than the percentage accepted in naked membranes (Figure 2). In contrast, on arrays sealed with PE-69, 7% of the spots were rejected.

These results showed that PVC and PVDC were the best sealing plastics for arrays compared to PE-69. However, working with 13  $\mu\text{m}$ -thick PVC can be troublesome because the plastic easily wrinkles and the hybridization solution sometimes leaks from the thermally sealed edges. Since PVDC is also not easily available in countries other than the USA, we tested additional polyethylene-based plastics which are used to produce plastic bags worldwide. These plastics were thinner than PE-69 (7  $\mu\text{m}$  and 29  $\mu\text{m}$ ) and were compared with PVC (Figure 3). The radioactive emission was the only parameter that showed significant variation between the three kinds of plastics. Whereas PE-7 had a similar transmittance to PVC, PE-29 clearly had a higher shielding effect, transmitting only 82% of the emission detected with PVC. The differences in the number of detected spots and accepted genes between the three plastics were very small and not significant. Based on these results, and because PE-29 is easier to handle than PE-7 and PVC, we conclude that sealing arrays with PE-29 plastic is a good alternative choice for increasing the signal detection in nylon arrays.

The differences we found may be explained by the two factors that most influence the transmittance of any material, namely chemical composition and thickness. Thus, PVDC and PVC had the same thickness and very similar performances. Among the polyethylene plastics, the lower performance of PE-69 probably reflected its greater thickness. However, although the difference in thickness between PE-29 and PE-7 affected the transmittance, no significant differences were found in the number of spots detected or accepted. This may indicate that transmittance becomes a problem only below a certain threshold level.

In conclusion, our findings indicate that the choice of the sealing plastic is very important to obtain the maximum information from nylon arrays. Among the plastics tested, PVDC showed the best performance, although in countries where this is not available, PE-29 proves a good alternative. Based on these findings, we have used PE-29 in various experiments, including the search for cold-induced genes from sugarcane (1), and the results from the hybridizations used in this work will be published elsewhere. We recommend that researchers using other plastics should check the shielding effect in order to obtain the most information from their nylon arrays.

#### **Acknowledgements and other information**

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (00/07433-0), the European Commission INCO-DC (ICA4-CT2000-30017) and PADCT/CNPq (62.0472/98.7). APCN, RDD and JMF were recipients of fellowships from CNPq, CAPES and FAPESP, respectively. Address correspondence to Marcelo Menossi, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6010, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil. E-mail: menossi@unicamp.br.

## References

1. **Nogueira, F.T.S., V. E. De Rosa Jr., M. Menossi, E. C. Ulian, and P. Arruda.** 2003. RNA Expression Profiles and Data Mining of Sugarcane Response to Low Temperature. *Plant Physiol.* 132:1811-1824.
2. **Ohira, T., S. Akutagawa, J. Usuda, T. Nakamura, T. Hirano, M. Tsuboi, K. Nishio, F. Taguchi, N. Ikeda, H. Nakamura, C. Konaka, N. Saijo, and H. Kato.** 2002. Up-regulated expression of angiogenesis factors in post-chemotherapeutic lung cancer tissues determined by cDNA macroarray. *Oncol. Rep.* 9:723-728.
3. **Hirai, M.Y., T. Fujiwara, M. Awazuhara, T. Kimura, M. Noji, and K. Saito.** 2003. Global expression profiling on sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *Plant J.* 33:651-663.
4. **Decraene, C., B. Brugg, M. Ruberg, E. Eveno, C. Matingou, F. Tahi, J. Mariani, C. Auffray, and G. Pietu.** 2002. Identification of genes involved in ceramide-dependent neuronal apoptosis using cDNA arrays. *Genome Biol.* 3:1-22.
5. **Jongeneel, C.V., C. Iseli, B.J. Stevenson, G.J. Riggins, A. Lal, A. Mackay, R.A. Harris, M.J. O'Hare, A.M. Neville, A.J.G. Simpson, and R.L. Strausberg.** 2003. Comprehensive sampling of gene expression in human cell lines with massively parallel signature sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:4702-4705.
6. **Bishop, J.O., J.G. Morton, M. Rosbash and M. Richardson.** 1974. Three abundance classes in HeLa cell messenger RNA. *Nature* 250:199-204.
7. **Vettore, A.L. F.R. da Silva, E.L. Kemper, and P. Arruda.** 2001. The libraries that made SUCEST. *Genet. Mol. Biol.* 24:1-7.
8. **Woolson, R.F.** 1987. *Statistical Methods for the Analysis of Biomedical Data.* Wiley, New York.
9. **Larkin, P., T. Sabo-Attwood, J. Kelso, and N.D. Denslow.** 2002. Gene expression analysis of largemouth bass exposed to estradiol, nonylphenol, and p,p'-DDE. *Comp. Biochem Physiol* 133:543-557.
10. **Schummer, M., W.V. Ng, R.E. Bumgarner, P.S. Nelson, B. Schummer, D.W. Bednarski, L. Hassell, R.L. Baldwin, B.Y. Karlan, and L. Hood.** 1999. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. *Gene* 238:375-385.

Legends:

**Figure 1: Example of the effect of plastics on signal detection.** Plasmids containing sugarcane ESTs were obtained from the SUCEST RT1 library made from sugarcane root RNA (7). Plasmid DNA obtained by alkaline lysis was denatured with 0.2 M NaOH and spotted onto nylon filters (Hybond-N, AP-Biotech, USA) with a hand-held 96-pin printhead tool (V&P-Scientific, USA), which typically deposited 0.1  $\mu$ l (around 10 ng) of DNA solution, as described by Schummer *et al.* (10). DNA was fixed to the filters by baking at 80°C for 2 h. Each filter contained 768 ESTs in duplicate, giving a total of 1536 spots per filter.  $^{33}$ P-labelled cDNA was produced from 30  $\mu$ g of total RNA and hybridized to nylon arrays essentially as described by Nogueira *et al.* (1). Left: image of radioactive emission of a naked membrane. Right: image of radioactive emission of a replicate membrane sealed with PE-69.

**Figure 2: Effect of sealing plastics on the geometric means of the ratios of total emission, detected spots and accepted genes.** The values obtained for each sealed filter were divided by those previously detected for the same filter without sealing. In the NM group, the values were determined twice without sealing in order to control radioisotope decay. The geometric mean of four ratios is displayed for each group. Letters at the top of each column indicate significantly different groups ( $p < 0.05$ ).

**Figure 3: Performance of polyethylene plastics compared to PVC.** The ratios were determined as in figure 2. Letters at the top of each column indicate significantly different groups ( $p < 0.05$ ).

Figure 1:

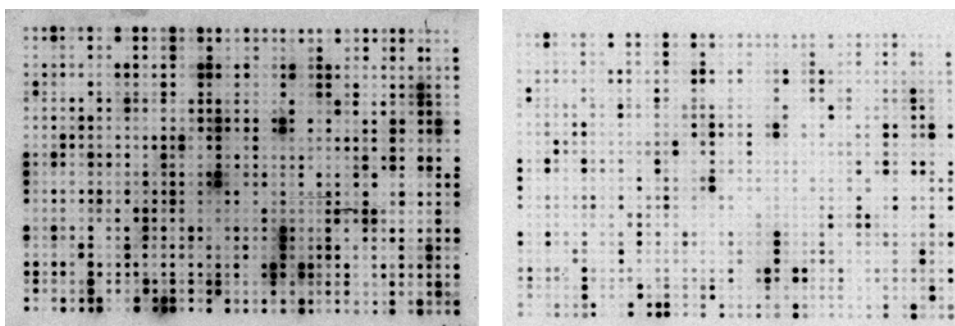


Figure 2:

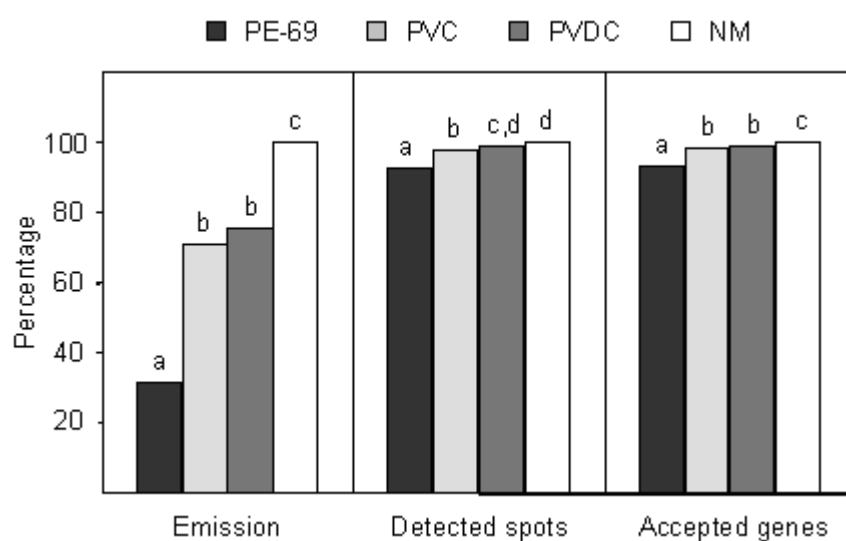
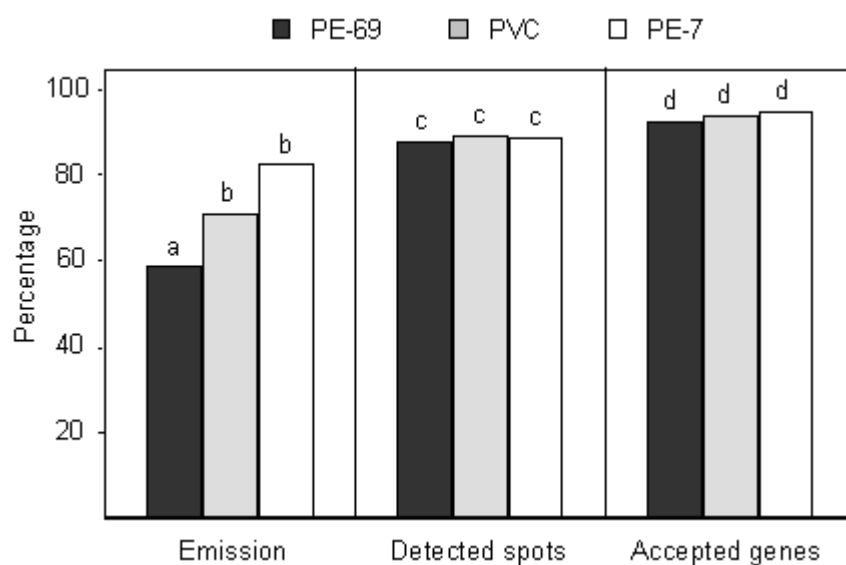


Figure 3:





## 8) CONCLUSÕES

- ❖ O gene *HHP* tem sua expressão aumentada pela exposição de plantas selvagens de *Arabidopsis thaliana* estressadas por baixa temperatura.
- ❖ O gene *HHP* aumenta a tolerância de plantas transgênicas de *A. thaliana* a baixas temperaturas.
- ❖ A localização subcelular da proteína HHP fusionada com GFP é predominantemente plastídica.
- ❖ A análise da expressão gênica em células de cana-de-açúcar permitiu identificar novos genes modulados por NO, ampliando a compreensão sobre o modo de ação desse radical.
- ❖ A seleção de materiais plásticos com maior transmitância aumenta as chances de se obter o máximo de informações em experimentos de macroarrays.

## 9) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn, S. J., Im, Y. J., Chung, G. C., Seong, K. Y., Cho B. H. (2000) Sensitivity of plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase of cucumber root system in response to low temperature. *Plant Cell Reports*, vol. 19, p. 831-835.
- Alvarez, M. E., Pennel, R. P., Meijer, P. J., Ishikawa, A., Dixon, R. A., Lamb, C., (1998). Reactive Oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, vol. 92, p. 773-784.
- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K., Miyano, S., Views: Fundamental Building Blocks in the Process of Knowledge Discovery, In: *Proceedings of the 14th International FLAIRS Conference*, 233-238, AAAI Press, 2001.
- Barroso, J., Corpas, F. J., Carreras, A., Sandalio, L. M., Valderrama, R., Palma, J. M., Lupiáñez, Del-Rio, L. A. (1999) Localisation of Nitric Oxide Synthase in Plant Peroxisomes. *Journal Biol. Chem*, vol. 274, p. 36729-36733.
- Beligni, M. V. e Lamattina, L. (1999) Nitric Oxide Protects against Cellular Damage Produced By Methylviologen Herbicides in Potato Plants. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, vol. 3, p. 199-208.
- Beligni, M.V. Fath, A. Bethke, P.C Lamattina, L, Jones, R.L. (2002) Nitric Oxide Acts as an Antioxidant and Delays Programmed Cell Death in Barley Aleurone Layers. *Plant Physiology*, vol. 129, p. 1642-1650
- Bolwell, G. P. (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 2, p. 287-294.
- Bowler, C., Neuhaus, G., Yamagata, H, Chua, N. H. (1994). Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell*, vol. 77, p. 73-81.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P. e Lamb, C.(1992) Elicitor and Wound-Induced Oxidative Cross-linking of a Proline -Rich Plant Cell Wall Protein: A Novel, Rapid Defense Response. *Cell*, vol. 70, p. 21-30.
- Brasileiro, A. C. M., Dusi, D.M.A (1998) Transformação genética de plantas. In: Torres, A. C., Caldas, L. S. ed. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABTCP/EMBRAPA-CNPQ.
- Bredt, D. S. & Snyder, S. H. (1989) Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 86, p. 9030-9033.
- Bredt, D. S. & Snyder, S. H. (1990) Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 87, p. 682 - 685.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C. Reed, R. R. & Snyder, S. H. (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, vol. 351, p. 714 - 718.
- Brown, G. C. & Cooper, C. E. (1994) Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Letters*, vol, 356, p. 295-298.
- Caro, A., Puntarulo, S. (1998). Nitric oxide decreases superoxide anion generation by microsomes from soybean embryogenic axes. *Physiologia Plantarum*, vol. 104, p. 357-364.

- Cassina, A. Radi, R. (1996) Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*, vol., 328, p. 309-316.
- Cazalé, A.C., Rouet-Mayer, M.A., Barbier-Brygoo, H., Mathieu, Y., Laurière, C. (1998). Oxidative Burst and Hypoosmotic Stress in Tobacco Cell Suspensions. *Plant Physiology*, vol. 116, p. 659-669.
- Chandok, M.R., Ytterberg, J.A., Van-Wijk, K.J., Klessig, F. (2003) The Pathogen-Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) in Plants is a Variant of the P Protein of the Glycine Descarboxylase Complex. *Cell*, vol. 113, p. 469-482.
- Chung, R.P.T., Neumann, G.M., Polya, G.M. (1997). Purification and Characterization of basic proteins with in vitro antifungal activity from seeds of cotton, *Gossypium hirsutum*. *Plant Science*, vol. 127, p. 1-16.
- Clark, D., Duner, J., Navarre, D.A., Klessig, D.F. (2000) Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Mol Plant Microbe Interaction*, vol. 13, n.12, p. 1380-1384.
- Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH. (1994) Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Letters*, vol., 345, n.1, p. 50-54.
- Costa-Netto, A.P., Braga, N.R., Ito, M.F., Braga, M.R., Martins, I.S. (1999). Indução da produção de fitoalexinas por *Diaphorte phaseolorum f. meridionalis* em cultivares de soja com diferentes graus de resistência ao cancro da haste. *Anais: XXI RESEM*. P.53.
- Cough, S. J., Bent, A. F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The plant Journal*, vol. 16, n.6, p. 735-743.
- Crane, B. R., Arvai, A. S., Gachhui, R., Wu, C., Ghosh, D. K., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J., Tainer, J. A. (1997) The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science*, vol. 278, p. 425-431.
- Crane, B. R., Arvai, A. S., Ghosh, D. K., Wu, C., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J., Tainer, J. A. (1998) Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science*, vol. 279, p. 2121-2126.
- Cueto M., Hernández - Perera, O., Martín R., Bentura, M. L., Rodrigo, J., Lamas, S., Golvano, M. P. (1996). Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett*, vol. 398, p. 159 - 164.
- De Nizi, P., Zocchi, G. (1996) The role of calcium in the cold shock responses. *Plant Science*, vol. 121, p. 161-166.
- De Oliveira MG, Shishido SM, Seabra AB, Morgon NH. (2002) Thermal stability of primary s-nitrosothiols: Roles of autocatalysis and structural effects on the rate of nitric oxide release. *J. Phys. Chem. A*, vol. 106, p. 8963-8970.
- Delledone, M, Xia, Y., Dixon, R.A. e Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, vol. 394, p. 585-588.
- Delledone, M., Polverari, A., Murgia, I. (2003) The functions of nitric oxide-mediated signaling and changes gene expression during the hypersensitive response. *Antioxidant Redox Signaling*, vol. 5, n.1, p. 33-41.

- Desfeux, C. D., Clough, S. J., Bent, A. F. (2000) Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium* –mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiol.*, vol. 123, p. 895-904.
- Dietrich C, Maiss E. (2003) Fluorescent labelling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. *J Gen Virol.*, vol 84, n.10, p. 2871-2876.
- Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., Miura, S., Seki, M., Shinosaki, K., Yamaguchi-Shinosaki, K. (2003) OsDREB genes in rice *Oriza sativa* L., encode transcription activators that function in drought, high salt and cold responsive gene expression. *The Plant Journal*, vol. 33, p. 751-763.
- Durner, J., Gow, A. J., Stamler, J. S., Glazebrook, J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 7, p. 14206-14207.
- Durner, J., Klessig, D. F. (1999), Nitric Oxide as a Signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 2, p. 369-374.
- Durner, J.; Wendehenne, D.; Klessig, D.F. (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 95, p. 10328-10333
- Estelle, M.A., Somerville, C. R. (1986) The mutants of *Arabidopsis*. *Trend in Genetics*, vol. 2, p. 58-64.
- Förstermann, U., Schimidt, H. H. H. W., Pollock, J. S., Sheng H., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Nakane, M. & Murad, F. (1991) Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.*, vol. 42, p. 1849 - 1857.
- Gamborg, O. L. (1966). Aromatic metabolism in plants. II. Enzymes of the shikimate pathway in suspension cultures of plant cells. *Canadian Journal. Biochemistry*, vol., 44, p. 791–799
- Garcês, H., Durzan, D., Pedroso, M.A. (2001) Mechanical Stress Elicits Nitric Oxide Formation and DNA Fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*, vol. 87, p. 567-574.
- Garcia-Mata, C., Gay, R., Sokolovski, S., Hills, A., Lamattina, L., Blatt, M.R. (2003) Nitric oxide regulates K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol., 100, n.19, p. 11116-11121.
- Garcia-Mata, C., Lamattina, L. (2001) Nitric Oxide Induces Stomatal Closure and Enhances the Adaptive Plant Responses against Drought Stress. *Plant Physiology*, vol., 126, p. 1196-1204.
- Gestelem, P.V., Asard, H., Horemans, N., Caubergs, R.J. (1998). Superoxide producing NAD(P)H oxidases in plasma membrane vesicles from elicitor responsive bean plants. *Physiologia Plantarum*, vol. 104, p. 653-660.
- Giba, Z., Grubisic, D, Konjevic, R. (1994). The Effect of electron acceptors on the phytochrome –controlled germination of *Paulownia tomentosa* seeds. *Physiologia. Plantarum*, vol. 91, p. 290-294.
- Giba, Z., Grubisic, D, Konjevic, R. (1999). *Arch. Biol. Sci.*, vol. 51, p. 121-129.
- Gilmour, S. J., Sebolt, A. M., Salazar, M. P., Everard, J. D., Tomashow, M. F. (2000) Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiology*, vol. 124, p. 1854-1865.

- Giovanelli, J. (1980) Aminotransferases in higher plants. Pages 329-358 in: B.J. Miflin (ed.) The biochemistry of plants, vol.5 Academic Press, New York.
- Glazener, J.A., Orlandi, E.W. e Barker, J.C. (1996) The active oxygen response of cells suspensions is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiology*, vol. 110, p. 759-763.
- Gouvêa, C. M. C. P., Souza, J. F., Magalhães, A. C. N. & Martins I. S. (1997) NO<sup>•</sup>-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation*, vol. 21, p. 183 - 187.
- Griffit, O. W., Stuehr, D. J. (1995) Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanism. *Annu. Ver. Physiol.*, vol. 57, p. 707-736
- Guo, F.Q., Okamoto, M., Crawford, N.M. (2003) Identification of a Plant Nitric Oxide Synthase Gene Involved in Hormonal Signaling. *Science*, vol. 302, p. 100-103.
- Guy, C., L., (1990) cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of preprotein metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, vol. 41, p. 187-223.
- Halverson, L. J., Stacey, G. (1986) Signal Exchange in Plant-Microbe Interactions. *Microbiological Reviews*, vol. 50, n. 2, p. 193-225.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. (1997). Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, vol. 48, p. 575-607.
- Harding, S.A., Roberts, D.M. (1998). Incompatible pathogen infection results in enhanced reactive oxygen and cell death responses in transgenic tobacco expressing a hyperactive mutant calmodulin. *Planta*, vol. 206, p. 253-258.
- Hart, T.W. *Tetrahedron Letters* 1985, vol. 26, p. 2013.
- Hevel, J. M., White, K. A. & Marletta, M. Af. (1991) Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase identification as a flavoprotein. *J. Biol. Chem.*, vol. 266, p. 22789 - 22791.
- Higa, A., Hidaka, T., Minai, Y., Matsuoka, Y., Haga, M. (2001) Active oxygen radicals induce peroxidase activity in rice blade tissues. *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 65, n.8, p. 1852-1855.
- Hirsh, R.E., Lewis, B. D., Splading, E. P., Sussman, M. R. (1988) A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science*, vol. 280, p. 918-921.
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J., Schilperoot, R. A. A. (1983) A binary vector strategy based on separation of vir and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, vol. 303, p. 179-180.
- Huang, S., Kerschbaum, H.H., Engel, E., Hermann, A. (1997) Biochemical Characterization and Histochemical Localization of Nitric Oxide Synthase in Nervous System of Snail, *Helix Pomatia*. *Journal of Neurochemistry*, vol., 69, n.6, p. 2516-2528.
- Huang, X., Von-Rad, U., Durner, J. (2002) Nitric Oxide induces transcriptional activation of nitric oxide tolerant alternative oxidase in Arabidopsis suspensions cells. *Planta*, vol.5, n.6, p. 914-923.
- Hughes, M. A., Dunn, M. (1996) The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *Journal exp. Botany*, vol. 47, p. 291-305.
- Ishitani, M., Xiong, L., Lee, H., Stevenson, B., Zhu, J. K. (1998) HOS1 a genetic locus involved in cold responsive gene expression in Arabidopsis. *The plant Cell*, vol. 10, p. 1151-1161.

- Jabs, T., Tschope, M., Colling, C. Hahlbrock, K. e Scheel, D. (1997) Elicitor – stimulated ion fluxes and  $O_2^-$  from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 94, p. 4800-4805.
- Jaglo-Ottosen, K. R., Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Schabenberger, O., Tomashow, M. F. (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. Science, vol. 280, p. 104-106.
- Janssens, S. P., Shimouchi, A., Quertermous, T., Bloch, D. B., and Bloch, K. D. (1992). Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium - derived relaxing factor/nitric oxide synthase. J. Biol. Chem, vol. 267. p. 14519 - 14522.
- Kaothien, P., Kawaoka, A., Ebinuma, H., Yoshida, K., and Shinmyo, A. (2002). Ntlim1, a PAL-box binding factor, controls promoter activity of the horseradish wound-inducible peroxidase gene. Plant Molecular Biology, vol., 49, p. 591-599
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinosaki, K., Shinosaki, K. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress inducible transcription factor. Nat., Biotech., vol.17, p. 287-291.
- Khokhlova, L., Olinevich, O., Pahlich, E., Tarakanova, N., Asafova, E., Volovnic, I. (1997) Effect of tubulin protein modifiers on the water exchange of non hardened and cold hardened plants of winter wheat. Acta Agro Hungarica, vol. 45, p. 377-389.
- Klatt, P., Heinzl, B., Jonh, M., Kastner, M., Böhme, E., Mayer, B. (1992)  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent cytochrome c reductase activity of brain nitric oxide synthase. The J. of Biol. Chem., vol. 267, n. 16, p. 11374-11378.
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., Sanford, J.C. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acid into living cells.
- Knight, H, Knight, M. R. (2000) Imaging spatial and cellular characteristics of low temperature calcium signature after cold acclimation in arabidopsis. Journa Exp. Botany, vol. 51, n. 351, p. 1679-1686.
- Knight, H, Veale, E. L., Warren, G. J., Knight, M. R. (1999) The sfr6 mutation in *Arabidopsis* suppresses low temperature induction of genes dependent on the CRT/DRE sequence motif. The Plant Cell, vol. 11, p. 875-886.
- Koch, W., Wagner, C., Seitz, H.U. (1998). Elicitor –induced cell death and phytoalexin synthesis. Planta, vol. 206, p. 523-532.
- Kocsy, G., Ballmoos, P. von, Rüegsegger, A., Szalai, G., Galiba, G. (2001) Increasing the gluathione content in a chilling-sensitive maize genotype using safeners increase protection against chilling-induced injury. Plant Physiol., vol. 127, p. 1147-1156.
- Kristensen, B.K., Brandt, J., Bojsen, K., Thordal-Christensen, H., Kerby, K.B., Collinge, D.B., Mikkelsen, J.D., Rasmussem, S.K. (1997). Expression a Defense –related intercellular barley peroxidase in transgenic tobacco. Plant Science, vol. 122, p. 137-182.
- Lalk, I., Dorffling, K. (1985) Hardening, abscisic acid, proline and freezing resistance in two winter wheat varieties. Physiol. Plant., vol. 63, p. 287-292.
- Lamas, S., Marsden, P. A., Li G. K.,Tempst, P. & Michel, T. (1992). Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. Proc. Natl Acad. Sci. USA, vol. 89, p. 6348 - 6352.

- Lamb, C. e Dixon, R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biol.*, vol. 48, p. 251-275.
- Lee, B.H., Lee, H., Xiong, L., Zhu, J.K. (2002) A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression. *The Plant Cell*, vol. 14, p. 1235-1251.
- Leone, A. M., Palmer, R. M. J., Knowles, R. G., Francis, P. L., Ashton, D. S. & Mocanda S. (1991). Constitutive and inducible nitric oxide synthases are L-arginine N<sup>G</sup> - C<sup>G</sup> - dioxygenases. *J. Biol. Chem.*, vol. 266, p. 23790 - 23795.
- Leshem, Y. Y (1996). Nitric oxide in biological systems. *Plant Growth Regulation* vol., 18, p. 155 - 159.
- Leshem, Y.Y., Wills, R.B.H., Veng-Va Ku, V. (1998) Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (<sup>•</sup>NO)-as and endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiology Biochemistry*, vol. 36, p. 825-833.
- Leshem, Y.Y. and Haramaty, E. (1996). The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *J. Plant Physiol.*, vol. 148, p. 258-263.
- Levine, A., Tenhakem, R., Dixon, R.A. e Lamb, C. (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, vol. 79, p. 583-593.
- Levit, J. (1980) Responses of plants to environmental stresses, Vol1: Chilling, Freezing and High Temperatures Stresses, Ed 2. Academic Press, New York.
- Lowenstein, C. J., Alley, E. W., Raval, P., Snowman, A. M., Snyder, S. H., Russel, S. W. & Murphy, W. J. (1993) Macrophage nitric oxide synthase gene - two upstream regions mediate induction by interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 90, p. 9730 - 9734.
- Lowenstein, C. J., Glatt, C. S., Bredt, D. S. & Snyder, S. H. (1992). Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contracts with the brain enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, .vol. 89, p.6711 - 6715.
- Luit, A. H. van der, Olivari, C., Haley, A., Knight, M.R., Trewavas, A. J. (1999) Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expresión in tobacco. *Plant Physiol.*, vol. 121, p. 705-714.
- Lyons, C. R., Orloff, G. J., and Cunningham, J. M. (1992). Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* vol., 267, p. 6370 - 6374.
- Mackerness, S.A.H., Jonh, C.F., Jordan, B., Thomas, B. (2001) Early signaling components in ultraviolet-B responses: Distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Letters*, vol. 489, p. 237-242.
- Mader, M., Amberg-Fisher, V. (1982) Role of Peroxidase in lignification of tobacco cells I. Oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide and formation of hydrogen peroxide by cell wall peroxidases. *Plant Physiology*, vol. 70, p. 1128-1131.
- Magalhães, J. R., Pedroso, M. C., Don Durzan (1999). Nitric oxide, Apoptosis and Plant Stress. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, vol. 5, p. 115-125.
- Maia, I. G., Benedetti, C. E., Leite, A., Turcinelli, S. R., Vercesi, A. E., Arruda, P. (1998) AtPUMP: na arabidopsis gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein. *FEBS Letters*, vol. 429, p. 403-406.

- Marletta, M. A. (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* vol. 268, p. 12231 - 12334.
- Martín, R., Martínez - Murillo, R., Bentura, M. L., Rodrigo, J. and Galvano, M. P. (1995). Presence of the enzyme nitric oxide synthase in root nodules of lupine plants (*Lupinus albus* cv. Multolupa). *Plant Microbe Inter.*, vol. 19, S. 335.
- Martínez, A. (1995). Nitric oxide synthase in invertebrates. *Histochem. J.*, vol. 27, p. 770 - 776.
- Mayer B., John, M., Heinzl , B., Werner E. R., Wachter, H., Schultz, G. and Böhme, E. (1991) Brain nitric oxide synthase is a bipterin - and flavin - containing multi - functional oxido - reductase. *FEBS Lett.*, vol. 288, p. 187 - 191.
- Mayer, B., Hemmens, B. (1997) Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Tibs*, vol. 22, p.477-481.
- Mayer, B., John, M. & Böhme, E. (1990) Purification of calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett.*, vol. 227, p. 215 - 219.
- McDowell, J. M., Dangl, J. L. (2000). Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 25, p. 89-92.
- Mensen, R., Achim, H., Salzer, P. (1998). Elicitor-induced changes of wall bound and secreted peroxidase activities in suspension cultured spruce (*Picea abies*) cells are attenuated by auxins. *Physiologia Plantarum*, vol. 102, p. 539-546.
- Mika, A., Luthje, S. (2003) Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes. *Plant Physiology*, vol., 132, p. 1489-1498.
- Millar, A.H., Day, D.A., (1996) Nitric Oxide inhibits the cytochrome oxidase but not alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Letters*, vol. 398, p. 155-158.
- Modolo LV, Cunha FQ, Braga MR, Salgado I. (2002) .Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. *Plant Physiology*, vol., 130, p. 1288-1297.
- Modolo, L. V., Braga, M. R., Martins, I.S. (2000). Involvement of nitric oxide in soybean defense response against the causal agent of stem canker disease. XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. P.36.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, vol. 15, p. 473-479.
- Nahalkova J, Fatehi J. (2003) Red fluorescent protein (DsRed2) as a novel reporter in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiol Lett.*, vol 225, n.2, p. 305-309.
- Navarre, D.A., Wendehenne, D., Durner, J., Noad, R., Klessig, D.F. (2000) Nitric Oxide Modulates the Activity of Tobacco Aconitase. *Plant Physiology*, vol., 112, p. 573-582.
- Ndong, C., Danyluk, J., Wilson, K.E., Pock, T., Huner, N.P.A., Sarhan, F. (2002) Cold-regulated, cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses. *Plant Physiol.*, vol. 129, p. 1368-1381.



- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J.T. (2002) Nitric Oxide is a Novel Component of Abisic Acid Signaling in Stomatal Guard Cells. *Plant Physiology*, vol., 128, p. 13-16.
- Ninnemann, H. and Maier, J. (1996) . Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochem. and Photobiol.*, vol. 64, p. 393 - 398.
- Nogueira, F. T. S., De Rosa Jr, V. E., Menossi, M., Ulian, E. C., Arruda, P. (2003) RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant Physiology*, vol. 132, p. 1-14.
- Noritake , T., Kawakita, K., Doke, N. (1996). Nitric oxide induces Phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant Cell Physiol.*, vol. 37, p. 113 - 116.
- Olinevich, O. V., Khokhlova, L. P., Raudaskoski, M. (2000) Effect of abscisic acid and cold acclimation on the cytoskeletal and phosphorylated proteins in different cultivars of *Triticum aestivum* L. *Cell Biology International*, vol. 24, n. 6, p. 365-373.
- Parker, J.E., Coleman, M.J. (1997). *TIBS*, vol. 22, p. 291-296.
- Pastori, G., Foyer, C.H., Mullineaux, P. (2000) Low temperature – induced changes in the distribution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants between the bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves. *Journal Experimental Botany*, vol. 51, n. 342, p. 107-113.
- Pedroso, M.C., Magalhaes, J.R., Durzan, D. (2000) A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. *Journal of Experimental Botany*, vol. 51, n. 347, p.1027-1036.
- Pfeiffer, S., Janystin, B., Jessner, B., Pichorner, H., Ebermann, R. (1994). Gaseous nitric oxide stimulates guanosine-3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) formation in spruce needles. *Phytochemistry*, vol. 36, p. 259-262.
- Pihakaski, M. K., Puhakainen, T., (1995) Effect of cold exposure on cortical microtubules of rye (*Secale cereale*) as observed by imunocytochemistry. *Physiology Plantarum*, vol. 93, p. 563-571.
- Pollock, J. S., Förstermann, U., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Schmidt, H. H. H. W., Nakane, M. & Murad, F. (1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 88, p.10480 - 10484.
- Pollock, J. S., Klinghofer, V., Förstermann, U. & Murad, F. (1992) Endothelial nitric oxide synthase is myristylated. *FEBS Lett.*, vol. 309, p. 402 - 404.
- Prasad, T. K., Anderson, M. D., Martín, B. A., Stewart, C. R. (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for the hydrogen peroxide. *Plant Cell*, vol. 6, p. 65-74.
- Ribeiro-Jr., E.A., Cunha, F.Q., Tamashiro, W.M.S.C., Martins, I.S. (1999). Growth phase-depedent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Letters*, vol. 445, p. 283-286.
- Ribeiro-Jr., E.A., Tamashiro, W.M.S.C., Martins, I.S. (1998) Resumos XXXVIIa reunião anual da sociedade brasileira de bioquímica e biologia molecular. p.34.
- Richardson, K., Fowler, S., Pullen, C., Skelton, C., Morris, B., Puterill, J. (1998) T-DNA tagging of a flowering time gene and improved gene transfer by in planta transformation of *Arabidopsis*. *Aust. J. Plant Physiology*, vol. 25, p. 125-130.

- Rikin, A., Atsmon, D., Gitler, C. (1983) Quantitation of chill-induced release of a tubulin like factor and its prevention by abscisic acid in *Gossypium hirsutum* L. *Plant Physiology*, vol. 71, p. 747-748.
- Rogers, S.G., Horsh, R.B., Fraley, R.T. (1986) Gene transfer in plants: production of transformed plants using Ti plasmid vectors. In: Weissbach, A., Weissbach, H., ed. *Plant Molecular Biology*. San Diego: Academic Press, 627-640 (Methods in enzymology, vol. 118).
- Roncato, L. D. B. (1997) Análise da atividade das enzimas peroxidase e -1,3-glucanases em variedades de soja (*Glycine max*) resistentes e suscetíveis ao fitopatógeno *Diaporthe phaseolorum*. Tese de mestrado, UFPR, 105p.
- Russel, A. J., Knigh, M. R., Cove, D. J., Knight, C. D., Trewavas, A., J., Wang, T. L. (1996) The moss, *Physcomitrella patens* transformed with apoaequorin cDNA responds to cold shock, mechanical perturbation and pH with transient increase in cytoplasmic calcium. *Transgenic Research*, vol. 5, p. 167-170.
- Salisbury, F.B., Ross, C.W. (1992) *Plant Physiology*. Fourth Edition, Wadsworth Publishing Company, Belmont California. 682 p.
- Santos KFR, Shishido SM, Laurindo FR, De Oliveira MG, Krieger MH. (2002). Characterization of the hypotensive effect of S-nitroso-N-acetylcysteine in normotensive and hypertensive conscious rats. *Nitric Oxide*, vol. 7, p. 57-66.
- Saviani, E. E., Martins, I. S., (2000). Effect of nitric oxide on the proliferation of suspension cultured cells of *Citrus sinensis*. XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. p.41.
- Schaller, A., Oecking, C. (1999). Modulation of Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Activity Differentially Activates Wound and Pathogen Defense Responses in Tomato Plants. *The Plant Cell*, vol. 11, n. 2, p. 263.
- Schenk A, Ivanchenko S, Rocker C, Wiedenmann J, Nienhaus GU. (2004) Photodynamics of red fluorescent proteins studied by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J.*, vol. 86, n.1, p. 384-94
- Schmidt, A., Scheel, D., Strack, D. (1998). Elicitor –stimulated biosynthesis of hydroxycinnamoylramines in cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*. *Planta*, vol. 205, p. 51-55.
- Schmidt, H. H. H. W., Hofmann, H., Ogilvie, P., Sennefelder, H., Weinberg, R. J. (1994) *Biochemistry and regulation of nitric oxide synthase*, p. 3-17.
- Schmidt, H. H. H. W., Pollock, J. S., Nakane, M. Gorsky, L. D., Förstermann, U. & Murad, F. (1991) Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating factor synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 88, p. 365 - 369.
- Schummer, M., W.V. Ng, R.E. Bumgarner, P.S. Nelson, B. Schummer, D.W. Bednarski, L. Hassell, R.L. Baldwin, B.Y. Karlan, and L. Hood. (1999) Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. *Gene*, vol. 238, p. 375-385.
- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinosaki, K., Carcini, P., Hayashizaki, Y, Shinosaki, K. (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stress by using a full length cDNA Microarray. *The Plant cell*, vol. 13, p. 61-72.

- Sen, S. and Cheema, R. (1995) Nitric oxide synthase and calmodulin immunoreactivity in plant embryonic tissue. *Biochem. Arch.*, vol. 11, p. 221 - 227.
- Shinwari, Z. K., Nakashima, K, Miura, S., Kasuga, M., Seki, M., Yamaguchi-Shinosaki, K., Shinosaki, K. (1998) An *Arabidopsis* gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low temperature responsive gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 250, p.161-170.
- Shishido S. M., de Oliveira MG. (2000) Polyethylene glycol matrix reduces the rates of photochemical and thermal release of nitric oxide from S-nitroso-N-acetylcysteine. *Photochem. Photobiol.*, vol. 71, p. 273-280.
- Steponkus, P. L., Uemura, M., Joseph, R. A., Gilmour, S. J., Tomashow, M. F. (1998) Mode of action the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 95, p. 14570-14575.
- Steponkus, P. L., Uemura, M., Webb, M. S. (1993) A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition. In: PL Steponkus, ed, *Advances in low temperature biology*, Vol2 JAI Press, London, 211-312.
- Stockinger, E. J., Gilmour, S. J., Tomashow, M. F., (1999) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 94, p. 1035-1040.
- Strand, A., Vaughan, H., Henkes, S., Huner, N, Gustafsson, P, Gardeström, P, Stitt, M (1999) Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmatic volume accompanies increased activities of enzymes in the calvin cycle and in the sucrose biosynthesis pathway. *Plant Physiol.*, vol. 119, p. 1387-1397.
- Stuehr, D. J., Cho, H. J., Know, N. S., Weise, M. F. & Nathan, C. F. (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 88, p. 7773 - 7777.
- Stuehr, D. J., Kwon, N. S.; Nathan, C. F.; Griffit, O. W.; Feldman, P. L. e Wiseman, J. (1991) N<sup>ω</sup>-hidroxi-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *The J. of Biol. Chem.*, vol 266, n. 10, p. 6259-6263.
- Stuehr, D. J., Structure-function aspects in the nitric oxide synthases (1997). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol 37, p. 339-359.
- Takahama, U., Hirota, S. (2000) Deglucosidation of Quercetin Glucosides to the Aglycone and Formation of Antifungal Agents by Peroxidase-Dependent Oxidation of Quercetin on Browning of Onion Scales. *Plant Cell Physiology*, vol. 41, n. 9, p. 1021-1029.
- Takeda, H., Kotake, T., Nakagawa, N., Sakurai, N., Nevins, D.J. (2003) Expression and Function of Cell Wall-Bound Cationic Peroxidase in *Asparagus* Somatic Embryogenesis. *Plant Physiology*, vol.131, p. 1765-1774.
- Tenhaken, R., Rübél, C. (1998). Induction of alkalinization and an oxidative burst by low doses of cycloheximide in soybean cells. *Planta*, vol 206, p. 666-672.

- Ukaji, N, Kuwabara, C., Takezawa, D., Arakawa, K, Fujikawa, S. (2001) Cold acclimation induced WAP27 localized in endoplasmatic reticulum in cortical parenchyma cells of Mulberry tree was homologous to group 3 late embryogenesis abundant proteins. *Plant Physiology*, vol 126, p.1588-1597.
- Valvekens, D., Montague, M. V., Lijsbettens, M. V. (1988) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* roots explants by using Kanamicinselection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 85, p.5536-5540.
- Veisz, O., Galiba, G., Sutka, J. (1996) Effect of abscisic acid on the cold hardiness of wheat seedlings. *Journal Plant Physiology*, vol 149, p. 439-443.
- Vettore, A.L. F.R. da Silva, E.L. Kemper, and P. Arruda. (2001). The libraries that made SUCEST. *Genet. Mol. Biol.*, vol. 24, p. 1-7.
- Welbaum, G. E., Bian, D., Hill, D., Grayson, R., Gunatilaka, M. (1997) Freezing tolerance, protein composition, and abscisic acid localization and content of pea epicotyl, shoot, and root tissue in response to temperature and water stress. *Journal Expe. Botany*, vol. 48, p.643-654
- Welling, A., Moritz, T., Palva, E.T., Olavi, J. (2002) Independent of cold acclimation by low temperature and short photoperiod in hybrid Aspen. *Plant Physiol.*, vol. 129, p.1633-1641.
- Wendehenne, D;P., Klessig, A., Durner, J.D.F. (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells: *TRENDS PLANT SCI.*, vol 6, n. 4. p.177-183
- Wilkinson, S., Clephan, A. L., Davies, W. J. (2001) Rapid low temperature-induced stomatal closure occurs in cold tolerant *Commelina communis* leaves but not in cold-sensitive tobacco leaves, via a mechanism that involves apoplastic calcium but not abscisic acid. *Plant Physiol.*, vol. 126, p. 1566-1578.
- Wojtaszek, P. (2000). Nitric Oxide in Plants: To NO or not to NO. *Phytochemistry*, vol. 54, p. 1-4.
- Xiao-Ming, Y., Griffith, M. (1999) Antifreeze proteins in winter rye leaves form oligomeric complexes. *Plant Physiol.*, vol. 119, p. 1361-1369.
- Xie, Q. W., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Ding, A., Troso, T. & Nathan, C. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, vol 256, p. 225 - 228.
- Xie, Q. W., Whisnant, R. & Nathan, C. (1993) Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, vol. 177, p.1779 - 1784.
- Xin, Z., Browse, J. (1998) *Esquimo1* mutants of arabidopsis are constitutively freezing-tolerant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 95, p. 7799-7804.
- Yamaguchi-Shinosaki, K., Shinosaki, K. (1994) A novel cis-acting element in *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low temperature or high salt stress. *Plant Cell*, vol. 6, p. 251-264.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., Takahashi, S. (1999). An alternative pathway for nitric oxide production in plants: New featured of an old enzyme. *Trends in Plant Science*, vol. 4, p.128-129.

- Yamasaki, H., Shimoji, H., Oshiro, Y., Sakihama, Y. (2001) Inhibitory Effects of Nitric Oxide on Oxidative Phosphorylation in Plant Mitochondria. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, vol, 10 , p.1-10.
- Yu, X. M., Griffith, M., (2001) Winter rye antifreeze activity increases in response to cold and drought, but not abscisic acid. *Physiol. Plant.*, vol. 112, p.78-86.

## 10) APÊNDICE

Resumos apresentados em congressos científicos:

1) XXI Reunião Anual Sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares, 23 a 25/08/1999, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS.

**INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE FITOALEXINAS POR *Diaporthe Phaseolorum* f. sp. *Meridionalis* EM CULTIVARES DE SOJA COM DIFERENTES GRAUS DE RESISTÊNCIA AO CANCRO DA HASTE.**

*Antônio Paulino da Costa Netto, Nelson Raimundo Braga, Margarida Fumiko Ito, Márcia Regina Braga & Ione Salgado Martins*

2) XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 27 a 30/05/2000, Caxambu-MG.

**BIOCHEMISTRY OF DRUGS: A DISCIPLINE FOR UNDERGRADUATED STUDENTS.**

*Antônio Paulino da Costa Netto, Daniela, G. Oliveira, Ilka, Nassif de Abreu, Paulo Góes Ribeiro, Rosabell F. Márquez, Eneida de Paula, Denize Vaz de Macedo, Maria E. Hoffmann, Bayardo B. Torres.*

3) 4<sup>o</sup> Simpósio Latino Americano de Ciência dos Alimentos, 12 a 15/11/2001, Campinas-SP.

**CINÉTICA DE GELIFICAÇÃO E AGREGAÇÃO DE CASEÍNA ACIDIFICADA COM GLUCONA-DELTA-LACTONA.**

*Ana A.L.M. Braga, Katiúchia P. Takeuchi, Antônio Paulino da Costa Netto, Marcelo Menossi, Roseane, L. Cunha.*

4) X Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP - 2002

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS DE ARABIDOPSIS THALIANA EXPRESSANDO O PROMOTOR ZM1 DE MILHO.**

*Melina Duarte, Antônio Paulino da Costa Netto, Marcelo Menossi.*

5) 7<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, ISPMB, 23 a 28/06/2003, Barcelona.

**A COLD AND ABA INDUCIBLE SUGARCANE GENE FUNCTIONALLY RELATED TO THE ATAF SUBFAMILY OF NAC DOMAIN PROTEINS.**

*Fábio Tebaldi S. Nogueira, Paulo Schlögl, Vicente E. De Rosa Jr, Antônio Paulino da Costa Netto, Patrícia Pompermayer, Paulo Arruda.*

6) Resumos do 49º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, SP, 16 a 19 de Setembro de 2003.

**ANÁLISE DA INTERFERÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE PLÁSTICO NA CAPTAÇÃO DE SINAL EM MACROARRANJOS DE DNA.**

*Antônio Paulino da Costa Netto, Rodrigo Duarte Drummond, Juliana de Maria Felix, Marcelo Menossi.*

7) Resumo International Conference of Engineering and Food ICEF 9-2004

**EFFECTS OF PROTEIN INTERACTIONS ON THE WATER BINDING BEHAVIOR FOR GELS OF MILK PROTEINS-SUCROSE-CARRAGEENAN.**

*Katiuchia P. Takeuchi, Antônio Paulino da Costa Netto, Marcelo Menossi, Roseane L. Cunha.*

8) Resumo International Conference of Engineering and Food ICEF 9-2004

**EXTENSIONAL VISCOSITY OF ACIDIFIED WHEY PROTEINS ISOLATED GELS.**

*Ângelo Luiz Fanzani Cavallieri, Antônio Paulino da Costa Netto, Marcelo Menossi, Roseane L. Cunha.*