

**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE  
CAMPINAS**

*mestrado*

**BC/51166**

**IB/ 81834**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**



**Universidade Estadual de Campinas**  
**Instituto de Biologia**



**Análise da expressão do gene lisina cetoglutarato  
redutase/sacaropina desidrogenase em milho submetido  
aos tratamentos com polietileno glicol, cloreto de sódio,  
metil-jasmonato e ácido abscísico**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Nathaly Nunes Uchôa  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

*Arruda*

Nathaly Nunes Uchôa  
Orientador: Prof. Dr. Paulo Arruda

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas (UNICAMP) para obtenção do  
grau de Mestre em Genética e Biologia  
Molecular, área de concentração  
Genética Vegetal e Melhoramento

Campinas – SP  
2002

UNIDADE IB/81834  
Nº CHAMADA T/UNICAMP  
Uc4a  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BCI 51166  
PRGC 16.837102  
C \_\_\_\_\_ D X \_\_\_\_\_  
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 0-11/01/02  
Nº CPU \_\_\_\_\_

CM00174640-3

BIB ID 259912

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**Uc4a**

**Uchôa, Nathaly Nunes**

Análise da expressão do gene lisina cetoglutarato redutase/sacaropina desidrogenase em milho submetido aos tratamentos com polietileno glicol, cloreto de sódio, metil-jasmonato e ácido abscísico/Nathaly Nunes Uchôa. –  
Campinas, SP:[s.n.], 2002

**Orientador: Paulo Arruda**

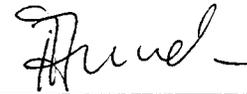
**Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia**

1.Milho. 2.Hormônios de plantas. 3.Stress(fisiologia). II. Arruda, Paulo.  
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
IV. Título.

**BANCA EXAMINADORA**

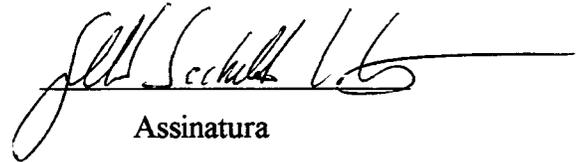
Campinas, 08 de agosto de 2002

Prof. Dr. Paulo Arruda



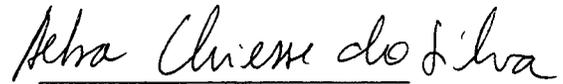
Assinatura

Prof. Dr. Gilberto Sachetto Martins



Assinatura

Profª. Dr.ª Alba Chiesse



Assinatura

Prof. Dr. Isabel Rodrigues Gerhardt

Assinatura

À minha família, por  
toda dedicação, carinho e  
amor.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, ao meu pai, à minha irmã e à minha Avó,

que compartilharam comigo os sonhos, as alegrias, as tristezas, a saudade, os choros, as decepções, etc... enfim, as inúmeras emoções vividas durante todo este tempo de mestrado. Sem o apoio e força da minha família eu não teria conseguido chegar até aqui! Obrigada por tudo!

Ao Rodrigo,

por todo seu carinho, sua compreensão, paciência, força, amizade, seu apoio e principalmente por todo seu amor!

À todos os meus amigos porque,

“Na vida nos deparamos com pessoas comuns, mas que se fazem especiais. Não por qualidade específica, nem por virtudes admiráveis. Especiais sim, por sem capazes de cativar o outro”

Marcelo Surpili, Nazeema, Laurent, Dri, Vicente, Lu, Dri Capella, Lê, Jú Félix, Silvia Regina, Carol, Almir, Susan, Ana Luiza, Luis, Alba, Gil, Marcia, etc... Inclusive os que não foram citados, porque o espaço é pequeno!

“Às meninas da secretaria”, Fabiana, Tânia e Sandra

por todo apoio, toda colaboração, ajuda, por tudo que fizeram por mim na “área burocrática”!

Às Pat-amigas: Lu, Sylvia, Bru e Paula J...

por todos os patmeetings, por toda força, amizade, carinho, enfim por tudo que passamos e que ainda vamos passar juntas!!

Ao Professor Paulo Arruda,

por ter me recebido em seu laboratório e pela orientação

À CAPES e à FAPESP,  
pelo apoio financeiro.

À Nossa Senhora Desatadora dos Nós,

pois se sobrevivi aos momentos difíceis que passei neste último ano, foi porque além de ter ao meu lado pessoas que me amam, tive também muita fé e esperança. Esta fé foi sempre representada pela devoção que tenho por Nossa Senhora, que sempre ouviu minhas preces e desatou os “nós” de minha vida, Amém.

## ÍNDICE

Resumo.....	11
Abstract.....	12
I Introdução.....	13
1.1 Metabolismo de lisina.....	13
1.2 O gene e a proteína LKR/SDH.....	16
1.3 Regulação do catabolismo de lisina.....	17
1.4 Jasmonatos.....	19
1.5 Ácido abscísico.....	21
1.6 Estresses hídrico.....	23
II Objetivo.....	26
III Material e métodos.....	27
3.1 Material vegetal.....	27
3.2 Tratamentos.....	27
3.3 Extração e quantificação do RNA total.....	28
3.4 <i>Northern blot</i> .....	28
3.5 Normalização das membranas.....	29
3.6 Extração de proteína.....	29
3.7 Ensaio de atividade enzimática.....	29
IV Resultados.....	31
4.1 Expressão da LKR/SDH na parte aérea de plântulas de milho.....	31
4.2 Expressão da LKR/SDH nas raízes das plântulas de milho.....	36
4.3 Atividades específicas de LKR e SDH.....	41
V Discussão.....	42
VI Conclusões.....	48

VII Perspectivas.....	49
VIII Referências bibliográficas.....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Via metabólica do aspartato.....	14
Figura 2	Via metabólica da sacaropina.....	15
Figura 3	Esquema das regiões regulatórias e codantes do gene que codifica a enzima bifuncional lisina cetoglutarato redutase/sacaropina desidrogenase (LKR/SDH) de milho.....	17
Figura 4	Diagrama mostrando a síntese do ácido jasmônico a partir do ácido linoléico em resposta ao desenvolvimento, aos sinais ambientais e à aplicação de jasmonatos.....	20
Figura 5	Representação simplificada dos genes induzidos por estresse osmótico.....	24
Figura 6	Análise da expressão do gene LKR/SDH em parte aérea de plântulas de milho tratadas com ABA.....	32
Figura 7	Análise da expressão do gene LKR/SDH em parte aérea de plântulas de milho tratadas com metil jasmonato.....	33
Figura 8	Análise da expressão do gene LKR/SDH em parte aérea de plântulas de milho tratadas com PEG.....	34
Figura 9	Análise da expressão do gene LKR/SDH em parte aérea de plântulas de milho tratadas com NaCl.....	35
Figura 10	Análise da expressão do gene LKR/SDH em raízes de plântulas de milho tratadas com ABA.....	37

Figura 11	Análise da expressão do gene LKR/SDH em raízes de plântulas de milho tratadas com metil jasmonato.....	38
Figura 12	Análise da expressão do gene LKR/SDH em raízes de plântulas de milho tratadas com NaCl.....	39
Figura 13	Análise da expressão do gene LKR/SDH em raízes de plântulas de milho tratadas com PEG.....	40
Figura 14	Via metabólica de conversão de L-lisina a L-prolina.....	44
Figura 15	Via de conversão de glutamato em vários metabólitos relacionados com estresse.....	46

## ABREVIACOES

ABA	cido abscísico
Abs	absorbância
ABRE	elemento de resposta ao ABA
AJ	cido jasmônico
cDNA	DNA complementar
DAP	dias após a polinizao
dCTP	desoxicitidina trifosfato
DNA	cido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitol
EDTA	cido etilenodiaminotetracético
Kb	quilobase
LKR	lisina cetoglutarato redutase
MeJa	metil-jasmonato
MPa	milipascal
NaCl	cloreto de sódio
<sup>32</sup> P α-dCTP	desoxicitosina trifosfato marcada com fósforo radioativo <sup>32</sup> P
pb	pares de base
PEG	polietileno glicol
RNA	cido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
SDH	sacaropina desidrogenase
SDS	dodecil sulfato de sódio
SSC	tampão salina-citrato
U	unidade de atividade enzimática
UV	ultravioleta

## RESUMO

Os vegetais estão sempre expostos a vários tipos de estresses ambientais como alta salinidade, seca, ferimentos, ataques de patógenos e insetos, variações de temperaturas, entre outros. Tais situações limitam o crescimento e o desenvolvimento do vegetal, além de comprometerem a sua produtividade. Por este motivo, desenvolveram mecanismos de adaptação e de resposta aos estresses, que envolvem desde a sua percepção e sinalização, até alterações celulares e fisiológicas mais drásticas. Muitos processos metabólicos estão envolvidos na produção de compostos que possibilitam uma maior tolerância por parte dos vegetais a estes estresses.

Situações de estresse hídrico levam ao acúmulo de osmólitos que são importantes na manutenção homeostática celular. A prolina, que é sintetizada nos vegetais a partir do ácido glutâmico, é o osmólito mais conhecido e estudado.

A lisina cetoglutarato redutase/sacaropina desidrogenase (LKR/SDH) é a principal enzima da via de degradação da lisina. Nesta via, uma molécula de lisina tem o potencial de gerar até três moléculas de ácido glutâmico, que é utilizado como precursor na síntese de prolina.

Neste trabalho, demonstramos que plântulas de milho tratadas durante 24 horas com os fitorreguladores ácido abscísico ou metil-jasmonato e submetidas a estresse salino, tiveram indução da expressão do gene LKR/SDH. Observamos também que o tratamento com solução de polietileno glicol não altera o padrão de expressão desse gene. Sugere-se, assim, um provável envolvimento da proteína codificada pelo gene LKR/SDH nos mecanismos de defesa vegetal a estresses abióticos.

## ABSTRACT

Plants are exposed to many types of environmental stress, such as salinity, drought, wounding, high and low temperatures and pathogen attack, which limits their growth and crop productivity in agriculture. Plants developed mechanisms to adapt and respond to such stressful conditions, from its perception and signaling by the cell to the physiological alterations resulting from the activation of these stress-response pathways. Many of these pathways are related to the production of chemicals that help the plants to tackle the stress problem.

Compatible osmolytes represent some of these compounds, that are accumulated during water stress. Proline is one of the most common osmolytes and in plants, it is synthesized from glutamic acid.

The enzyme lysine ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase (LKR/SDH) is the main enzyme in the lysine degradation pathway, whereby lysine has the potential to lead to the formation of up to three molecules of glutamate, the main precursor of proline in the plant cell. On the other hand, proline is the main osmoprotector accumulated in the cell after drought stress.

This work reports for the first time the induction of LKR/SDH gene expression in maize plantlets subjected to treatment with the phytohormones ABA or MeJa, the hypertonic solution of sodium chloride (NaCl) and polyethileneglycol (PEG) solution during 24 hours. Our results indicated that PEG did not alter the expression of the LKR/SDH gene, whereby a significant induction of the LKR/SDH gene transcription could be detected after treatment with abscisic acid, methyl-jasmonate and NaCl solution.

These results suggest that LKR/SDH can play an important role in the plant defense mechanisms by increasing the glutamate pool in the cell which can lead to the synthesis of proline, a known osmoregulator in plants.

## **I Introdução**

### **1.1 Metabolismo de lisina**

A lisina, um dos aminoácidos essenciais em mamíferos, é encontrada em baixas concentrações nas sementes dos cereais, que representam uma das principais fontes de proteína na dieta humana e animal. Sua baixa concentração nos cereais é consequência de processos complexos que envolvem síntese, incorporação em proteínas e degradação (Arruda *et al.*, 2000).

Nos vegetais superiores, a síntese de lisina ocorre através da via metabólica do aspartato que, além da lisina, é responsável pela síntese de mais três aminoácidos, a treonina, a metionina e a isoleucina. Esta via (Figura 1) envolve a participação de uma série de enzimas alostéricas que são retro-inibidas pelas concentrações dos produtos finais de suas reações (Azevedo *et al.*, 1997). O aspartato é o precursor inicial da sequência metabólica que leva à formação de lisina, metionina e treonina, sendo esta última a precursora da isoleucina. A aspartato quinase (AK), a primeira enzima desta via, tem sua atividade inibida pelas concentrações de treonina e lisina livres. Estes aminoácidos separadamente inibem a atividade da enzima do ramo específico de sua biossíntese, isto é, a lisina inibe a atividade da dihidrodipicolinato sintase (DHPS), e a treonina inibe a homoserina desidrogenase (HSD). Sendo assim, lisina e treonina regulam tanto a sua própria síntese como toda a via do aspartato (Azevedo *et al.*, 1997; Bryan, 1990; Galili, 1995)

A inibição da aspartato quinase por elevadas concentrações de lisina e treonina pode ser prejudicial às células, uma vez que acarreta a falta de substratos intermediários para síntese de outros aminoácidos, podendo com isso limitar toda a síntese protéica (Arruda e Silva, 1979).

Durante o desenvolvimento das sementes ocorre o acúmulo de proteínas de reserva, que em gramíneas são denominadas prolamina e constituem a principal fonte de nitrogênio durante a germinação do embrião. Estas proteínas são ricas em resíduos de asparagina, glutamina, arginina e prolina mas são deficientes em triptofano, lisina e treonina (Payne,

1983). Assim, o baixo conteúdo de determinados aminoácidos nas sementes é consequência da escassez destes em suas proteínas de reserva.

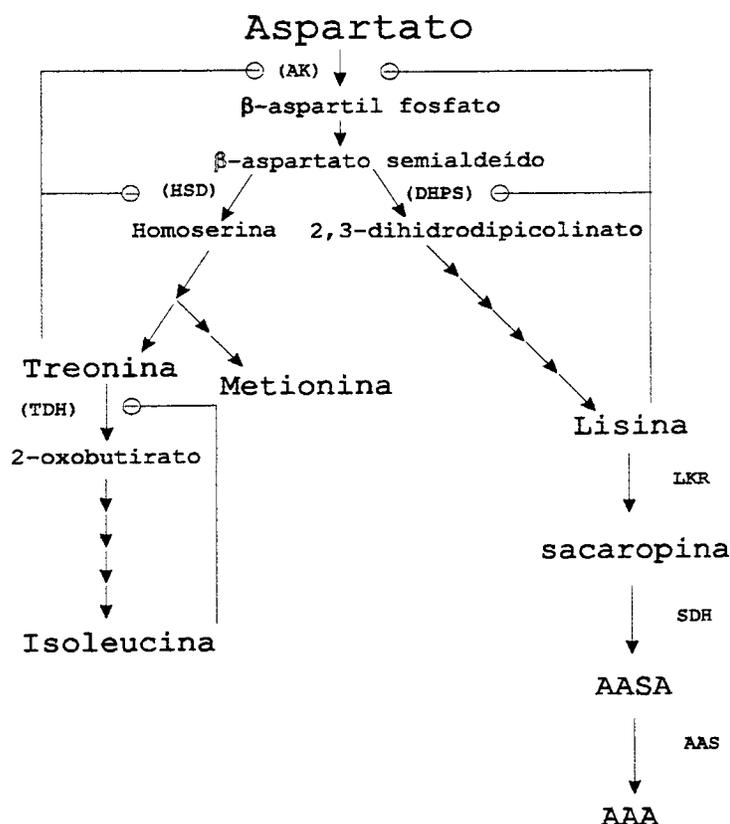


Figura 1: Via metabólica do aspartato. Os pontos de regulação negativa estão indicados pelas retas com círculo e sinal negativo. AK - Aspartato quinase; HSD - Homoserina desidrogenase; DHPS - dihidrodipicolinato sintase; TDH - Treonina desidrogenase; LKR - Lisina cetoglutatarato redutase; SDH - Sacaropina desidrogenase; AAS - Ácido  $\alpha$ -aminoadípico sintase; AASA - Ácido  $\alpha$ -aminoadípico- $\delta$ -semialdeído; AAA - Ácido  $\alpha$ -aminoadípico (modificado a partir de Bryan, 1990).

A síntese de lisina através da via do aspartato não representa a única fonte deste aminoácido para o desenvolvimento das sementes. Quantidades substanciais de lisina, aproximadamente 5% do total dos aminoácidos livres, são translocadas dos tecidos vegetativos para o endosperma durante o desenvolvimento da semente (Arruda e Silva, 1979). Porém, como as prolaminas são proteínas pobres em lisina, a demanda por este aminoácido é muito baixa (Shewry e Casey, 1999). Nestas circunstâncias, seria esperado um acúmulo de lisina nas sementes, o que não ocorre, já que o total deste aminoácido é mantido em torno de 1,5% durante todas as fases do desenvolvimento do endosperma (Arruda e Silva, 1983). Isto significa que o excedente deste aminoácido está sendo

catabolizado com a finalidade de manter a concentração de lisina livre em níveis não inibitórios à função de outras enzimas ou à síntese protéica basal.

A degradação da lisina nos vegetais ocorre pela da via da sacaropina (Figura 2). Nesta via, a lisina é condensada ao  $\alpha$ -cetogluturato formando sacaropina, através da atividade da enzima lisina cetogluturato redutase (LKR) que usa o co-fator NADPH. Na etapa subsequente, a sacaropina é hidrolisada em ácido  $\alpha$ -aminoadípico- $\delta$ -semialdeído (AASA) e glutamato, pela ação da enzima sacaropina desidrogenase (SDH) que utiliza os co-fatores  $\text{NAD}^+$  ou  $\text{NADP}^+$  (menos eficiente) (Gonçalves-Butruille *et al.*, 1996).

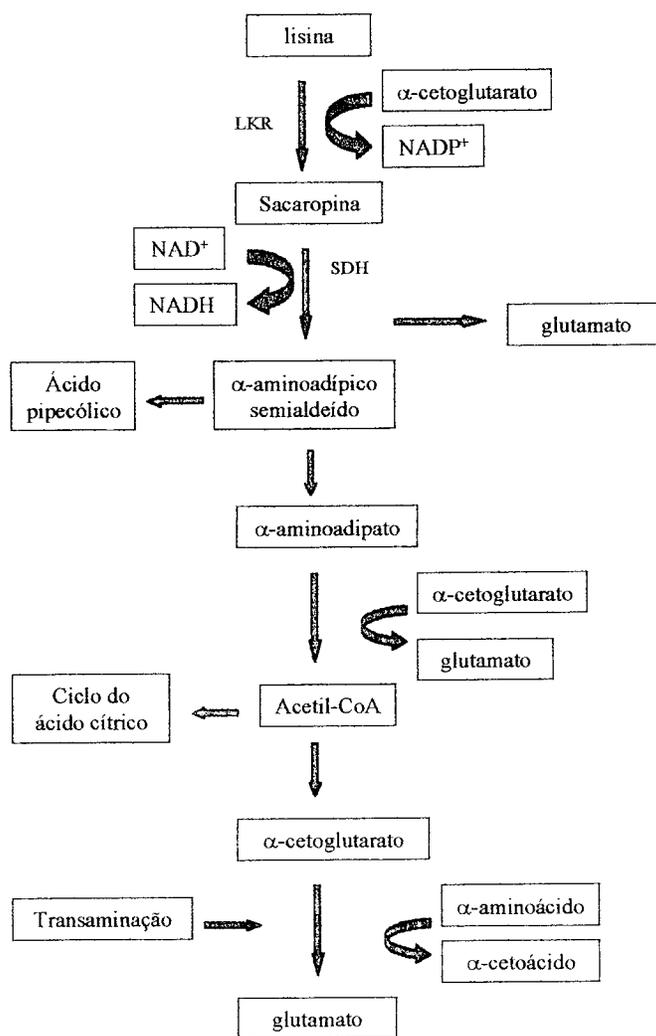


Figura 2: Via metabólica da sacaropina, a via de degradação de lisina em plantas. Sua principal enzima é a lisina cetogluturato redutase/sacaropina desidrogenase (LKR/SDH) que apresenta atividades de LKR e SDH, responsáveis pelas duas primeiras reações da via.

Uma outra molécula de ácido glutâmico pode ser formada se o AASA for convertido em  $\alpha$ -aminoadipato que, ao originar  $\alpha$ -cetoadipato, libera também uma molécula de glutamato. Alternativamente, AASA pode ser convertido em ácido pipercolico (Figura 2).

O  $\alpha$ -cetoadipato pode gerar duas moléculas de acetil-CoA que podem ser usadas no ciclo do ácido cítrico para gerar mais uma molécula de glutamato por transaminação com  $\alpha$ -cetoglutarato (Arruda *et al.*, 2000), ou ainda podem servir como precursores de compostos do metabolismo secundário (poliacetatos, flavonóides e terpenóides) envolvidos na defesa vegetal contra o ataque de patógenos (Paiva, 2000; Dixon e Steele, 1999; Dixon, 2001).

Portanto, na via da sacaropina uma única molécula de lisina oxidada tem o potencial para gerar até três moléculas de ácido glutâmico.

## 1.2 O gene e a proteína LKR/SDH

Análises da sequência do gene que codifica a enzima bifuncional LKR/SDH em milho revelaram tratar-se de um gene muito complexo e com sequência bem conservada comparada àquela de outros vegetais e animais.

Este gene de cópia única no genoma, contém 26 éxons que transcritos produzem um RNA mensageiro de 3.5 Kb, uma região de interdomínio que separa os domínios de LKR e de SDH, e ainda dois promotores, um acima da sequência completa correspondente à enzima bifuncional e outro interno entre as sequências codificadoras de LKR e de SDH. Conforme indicado na Figura 3, ambos os promotores contêm sequências reguladoras (CCAAT e TATA) e ainda prováveis sítios de ligação dos fatores de transcrição Opaco2 e GCN4 (Arruda *et al.*, 2000). Esta estrutura gênica permite que o dois promotores apresentem autonomia tanto para expressão como para interação entre eles (Galili *et al.*, 2001).

Uma propriedade da proteína LKR/SDH é que nesta única enzima estão presentes duas atividades enzimáticas, e cada uma possui um pH ótimo para sua atividade específica. Para a LKR o pH neutro é ótimo para sua atividade, ao passo que para SDH o pH ótimo é de aproximadamente 9 (Gaziola *et al.*, 1997; Miron *et al.*, 2000), indicando que a atividade específica de SDH é, de certa forma, ineficiente, já que o pH celular é neutro.

De acordo com Galili e colaboradores (2001) a consequência disso é que a planta necessita da atividade de SDH adicional à fornecida pela forma bifuncional LKR/SDH para manter a eficiência do catabolismo de lisina. Isto explica a detecção de RNA mensageiro da forma SDH monofuncional em *Arabidopsis* (Tang *et al.*, 1997) e em milho (Kemper *et al.*, 1999), apesar da proteína só ter sido confirmada por *western blot* em *Arabidopsis*.

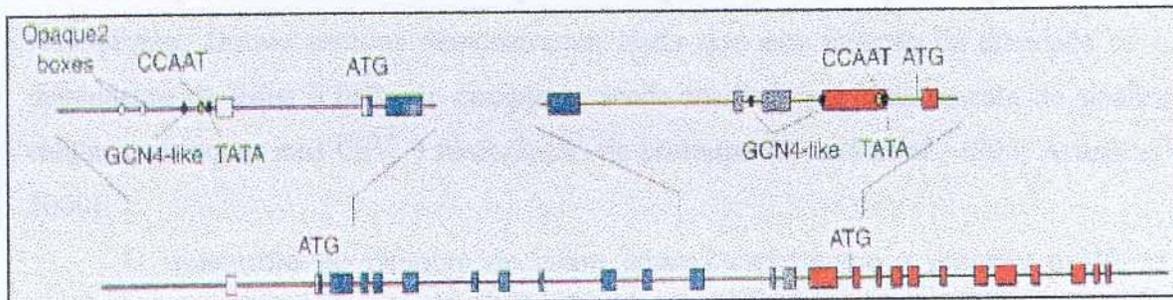


Figura 3: Esquema das regiões regulatórias e codantes do gene que codifica a enzima bifuncional lisina cetoglutarato redutase/sacaropina desidrogenase (LKR/SDH) de milho. No esquema inferior, os éxons estão representados por caixas e os íntrons por linhas. Os éxons azuis referem-se à região que codifica a LKR, os vermelhos a SDH. As caixas em cinza representam éxons da região interdomínios. O primeiro éxon não traduzido está representado em branco. No esquema ainda estão ampliadas (esquema superior) as regiões promotoras, acima da sequência completa do gene, e o promotor interno anterior à sequência da SDH. Estas regiões contêm sequências TATA, CCAAT e os prováveis sítios de ligação dos fatores opaque2 e GCN4 (modificado a partir de Arruda *et al.*, 2000).

A complexidade do locus da LKR/SDH não é restrita à codificação das formas bifuncional da LKR/SDH e monofuncional da SDH. Recentemente, análises de sequências ESTs relacionados com a LKR/SDH oriundas de bibliotecas de cDNA de algodão e de *Arabidopsis* revelaram a existência de uma nova forma enzimática, a LKR monofuncional (Galili *et al.*, 2001). Estes cDNAs possuem sequência de DNA idêntica ao domínio de LKR do cDNA da forma bifuncional, o que sugere que eles também devam ser codificados pelo locus LKR/SDH. Tanto a função fisiológica quanto os mecanismos de regulação da produção da LKR monofuncional ainda não foram elucidados.

### 1.3 Regulação do catabolismo de lisina

A regulação bioquímica do catabolismo de lisina ainda não foi totalmente esclarecida. Experimentos de alimentação de ratos com lisina ou aplicação de lisina em plantas de tabaco revelaram o estímulo da atividade de LKR tanto no fígado dos ratos como nas sementes de tabaco, respectivamente (Foster *et al.*, 1993; Karchi *et al.*, 1994), indicando que tanto em mamíferos quanto em plantas, a lisina pode regular seu próprio catabolismo. Outros estudos demonstraram ainda que esta indução da atividade de LKR dependente de lisina é bastante complexa, sendo mediada por uma cascata de sinalização celular que requer íons  $\text{Ca}^{2+}$  e fosforilação de proteínas (Karchi *et al.*, 1995; Arruda *et al.*, 2000).

O isolamento do mutante de milho *opaco2* representou a primeira evidência de alterações no catabolismo de lisina. Este mutante possui de 3 a 5 vezes mais lisina e 70% menos zeínas (proteínas de reserva) que sementes normais (Mertz *et al.*, 1964; Dalby e Tsay, 1975).

O gene *opaco2* codifica a proteína Opaco2, que atua como um ativador de transcrição do tipo bZIP (*basic/leucine zipper*). As proteínas desta classe apresentam um domínio rico em aminoácidos básicos, pelo qual se ligam a molécula de DNA e um outro domínio denominado zipper de leucinas responsável pela dimerização da molécula. Algumas destas proteínas são expressas constitutivamente em determinados tecidos vegetais (Kircher *et al.*, 1998), outras são induzidas por estímulos externos, como ácido abscísico (Gupta *et al.*, 1998; Bray, 1993; Yoshida *et al.*, 1997), metil jasmonato (Kim *et al.*, 1992; Creelman e Mullet, 1997), baixas temperaturas (Kusano *et al.*, 1995) e luz UV e visível (Klotz e Lagrimini, 1996; Williams *et al.*, 1992).

Fatores de transcrição do tipo bZIP se ligam ao promotor num sítio específico conhecido como G-box, já identificado em muitas espécies vegetais como uma sequência de DNA (C/TACGTG) altamente conservada.

Atualmente, sabe-se que o fator de transcrição Opaco2 é responsável pela regulação da transcrição dos genes que codificam as  $\alpha$ -zeínas, proteínas de reserva das sementes de milho, o que justifica as baixas concentrações destas proteínas no mutante *opaco2* (Schmidt *et al.*, 1992). Existem indícios de que este fator também esteja envolvido com a regulação

da transcrição do gene que codifica a LKR/SDH visto que no milho mutante *opaco2* a quantidade de transcritos e da proteína LKR/SDH são reduzidos, bem como as atividades enzimáticas específicas e a concentração de lisina livre que é maior que no milho normal (Kemper *et al.*, 1999).

Análises do padrão de expressão do gene LKR/SDH em milho revelaram que ele é altamente expresso no endosperma, esta expressão é coordenada com o desenvolvimento deste e com o acúmulo das proteínas de reserva (Arruda *et al.*, 1983; Kemper *et al.*, 1999). Ensaio imuno-histoquímico mostrou ainda que a maior expressão da LKR/SDH no endosperma de milho acontece na camada sub-aleurona, uma região com células em intensa divisão (Kemper *et al.*, 1999). Em *Arabidopsis*, a LKR/SDH é expressa nos órgãos florais e em tecido embrionário de sementes em desenvolvimento (Tang *et al.*, 1997).

A expressão deste gene, porém, não é restrita aos tecidos florais e sementes em desenvolvimento. Recentemente, verificou-se a indução da expressão deste gene e o aumento da atividade específica da enzima LKR/SDH em discos foliares de canola (*Brassica napus*) submetidos a estresse osmótico (Deleu *et al.*, 1999; Moulin *et al.*, 2000). Além disso, análises de ESTs de várias espécies vegetais têm demonstrado que este gene também é expresso em vários tecidos com células em divisão, como zona de abscisão, ápice radicular e calo (Arruda *et al.*, 2000), e ainda em tecidos tratados com elicitores bióticos (Galili *et al.*, 2001).

Juntos, estes dados sugerem que o catabolismo de lisina desempenha um papel regulatório em diferentes programas celulares associados a funções fisiológicas, ao desenvolvimento e às respostas vegetais a estresses bióticos e abióticos.

#### **1.4 Jasmonatos**

Os jasmonatos são fitormônios que influenciam o crescimento e o desenvolvimento dos vegetais. Sua aplicação exógena acarreta diferentes efeitos nas plantas como, a indução de senescência, de abscisão foliar, o estímulo da biossíntese de etileno, de  $\beta$ -caroteno e de ácido jasmônico, promove ainda o amadurecimento dos frutos, a inibição da germinação de sementes e também a resistência vegetal a insetos e patógenos (Creelman e Mullet, 1997).

A síntese do ácido jasmônico (AJ) ocorre a partir do ácido linoléico (Figura 4), que é um ácido graxo poli-insaturado, produzido pela ação das fosfolipases sobre os lipídios das membranas celulares que passando por várias reações químicas forma uma molécula de ácido jasmônico. Esta pode ainda ser catabolisada para formar metil-jasmonato (MeJa) e outras moléculas conjugadas que também possuem atividade biológica (Hamberg e Gardner, 1992; Wasternack *et al.*, 1998).

A concentração endógena dos jasmonatos nas plantas varia de acordo com o tecido e o tipo celular, o estágio do desenvolvimento e com alguns estímulos ambientais (Creelman e Mullet, 1995).

Quando uma planta é ferida ou submetida a uma força mecânica (Falkenstein *et al.*, 1991), a algum tipo de estresse hídrico (Creelman e Mullet, 1995), ao ataque de patógenos (Gundlach *et al.*, 1992), ou à aplicação de AJ ou MeJa, (Sembdner e Parthier, 1993; Creelman e Mullet, 1997), a concentração endógena dos jasmonatos aumenta rapidamente em virtude da indução de sua biossíntese. Tal indução ocorre primeiramente nos tecidos danificados e é posteriormente propagada para as células intactas, que passam imediatamente a sintetizar ácido jasmônico e outros compostos de defesa (Blée, 1998).

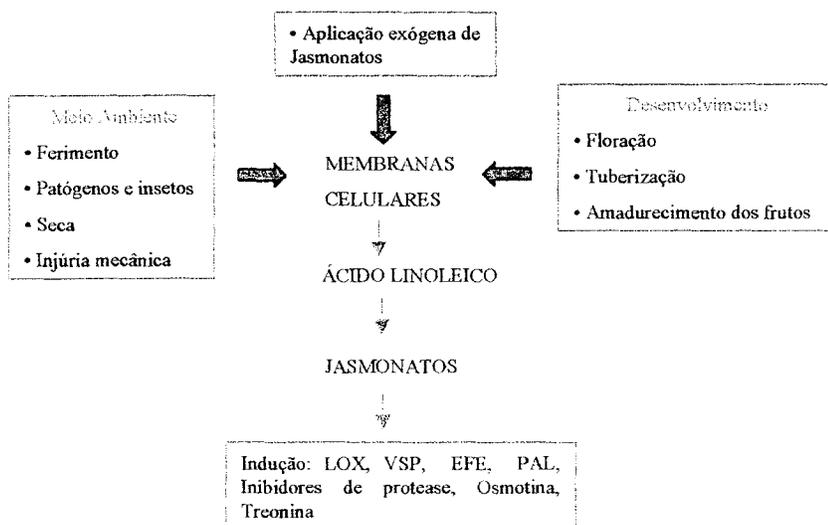


Figura 4: Diagrama mostrando a síntese do ácido jasmônico a partir do ácido linoléico em resposta ao desenvolvimento, aos sinais ambientais e a aplicação de jasmonatos. Alguns dos genes que são induzidos por jasmonatos. LOX (lipoxigenase)- envolvida na biossíntese do ácido jasmônico; VSP- proteínas de reserva; EFE - enzima de formação de etileno; PAL (fenilalanina amônia liase) - envolvida na biossíntese dos flavonóides; Inibidores de proteases, Osmotina e treonina - proteínas anti-fúngicas (modificado a partir de Creelman e Mullet, 1995).

O aumento da concentração de ácido jasmônico na planta altera a expressão de diversos genes. Análises da resposta aos jasmonatos em trinta espécies vegetais, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas, revelaram a indução de múltiplos genes, entre eles alguns que codificam proteínas com função de reserva (*Vegetative Storage Protein - VSP*), outros que codificam inibidores de proteases, genes envolvidos com a biossíntese de etileno, de ácido jasmônico, e ainda genes relacionados com a defesa vegetal que codificam proteínas e metabólitos secundários de função antibiótica e antifúngica, Figura 4 (Staswick, 1992; Gundlach *et al.*, 1992; Creelman e Mullet, 1997).

Alguns genes são reprimidos pelo excedente de ácido jasmônico produzido na planta, a maioria são genes cujos produtos estão envolvidos com a manutenção do metabolismo basal celular (*housekeeping*), tais como genes ribossomais e alguns genes relacionados à fotossíntese (Reinbothe *et al.*, 1994).

O estudo da região promotora de dois genes (*Pin2 e VspB*) que têm sua transcrição induzida por jasmonatos, demonstrou a existência de uma região comum de 50 pb que confere a resposta ao ácido jasmônico (Kim *et al.*, 1992; Masson *et al.*, 1993). Esta região contém uma sequência conhecida como G-box que funciona como um sítio para ligação de fatores de transcrição do tipo bZIP. O elemento G-box está presente no promotor de vários genes, mas nem todos respondem positivamente ao ácido jasmônico. Assim, Creelman e Mullet (1997), postularam que o ácido jasmônico deve agir ativando os fatores de transcrição destes genes, induzindo sua ligação à região promotora e promovendo a transcrição do gene.

A identificação e caracterização de novos genes induzidos pelos jasmonatos pode levar a um melhor entendimento dos mecanismos de atuação deste hormônio nos vegetais, tanto em relação ao crescimento e desenvolvimento quanto em relação às alterações que ele induz na expressão de genes, em resposta aos estímulos ambientais.

## 1.5 Ácido abscísico

O ácido abscísico é um fitormônio que regula o crescimento e o desenvolvimento dos vegetais, particularmente durante a formação das sementes e durante a resposta vegetal a estresses ambientais que envolvem perda de água (Giraudat, *et al.*, 1994).

O ABA é classificado como um hormônio comum à vários estresses, visto que seca, frio, alta salinidade, e outras situações que afetam a disponibilidade de água em alguma parte da planta, induzem o aumento de sua concentração endógena, através da indução de sua biossíntese (Yoshida, *et al.*, 1997; Bray, 1993)

Nos últimos anos muitos genes induzidos por ABA tem sido caracterizados nas partes vegetativas de plantas estressadas. Na maioria dos casos a primeira evidência de que a indução da expressão de um gene esteja relacionada com ABA, é a associação entre as concentrações de ABA e do transcrito deste gene. Um outro indício pode ser ainda a expressão do gene induzida pela aplicação de ABA em plantas não estressadas.

Tais observações apesar de serem compatíveis, não confirmam que o ABA produzido durante um estresse seja responsável por alterações na expressão gênica. Existem casos em que genes induzidos pela aplicação de ABA não são induzidos por estresses que acarretam no aumento da concentração endógena deste hormônio. O que indica que outros fatores podem estar envolvidos com a regulação da expressão gênica (Chandler e Robertson, 1994)

Os mecanismos pelos quais o ABA regula a expressão de alguns genes provavelmente envolvem eventos transcricionais e/ou eventos pós-transcricionais, como processamento do transcrito, estabilidade do RNA mensageiro, controle da tradução e da atividade da proteína (Chandler e Robertson, 1994). Atualmente, vários estudos estão voltados ao entendimento das bases moleculares da regulação gênica pelo ABA, que parece seguir o modelo geral, no qual fatores de transcrição se ligam a um elemento da região promotora de um determinado gene ativando assim a transcrição do gene (Ptashne, 1998).

As análises das seqüências de DNA de genes regulados por ABA como, *Em* (Marcotte *et al.*, 1989), *Rab* (Mundy *et al.*, 1990) e *Dc3* (Vivekananda *et al.*, 1992), mostraram que há um elemento de resposta a este hormônio (ABRE) na região promotora destes genes. A caracterização deste elemento mostrou que se trata de uma região bem conservada entre estes genes (Chandler e Robertson, 1994), e que fatores de transcrição do tipo bZIP se ligam especificamente a estas seqüências (Guiltinan *et al.*, 1990; Giraudat *et al.*, 1994), indicando também a presença do sítio G-box dentro delas.

Existem similaridades e diferenças na estrutura, propriedades físicas e na atividade do ácido abscísico e dos jasmonatos, porém estes reguladores são capazes de induzir o

mesmo grupo de proteínas em determinadas espécies, a exemplo de alguns de inibidores de protease e proteínas de reserva em canola. Porém, a compreensão das interações entre ABA, jasmonatos e outros hormônios vegetais, que regulam o desenvolvimento e o metabolismo, bem como o entendimento de suas vias de sinalização pela planta, dependerá da identificação e caracterização de novos genes comumente induzidos por estes reguladores (Staswick, 1992).

## 1.6 Estresse hídrico

O estresse hídrico ou osmótico se caracteriza pelo déficit de água no meio devido à seca, alta salinidade ou frio, o que altera de alguma forma a osmolaridade das células.

Nos vegetais, este tipo de estresse desencadeia um conjunto de respostas iniciado pela percepção e a sinalização do estresse, estendendo-se às alterações moleculares, bioquímicas, celulares, fisiológicas e de desenvolvimento. Estas mudanças permitem à planta sobreviver nesta condição adversa. Estas respostas dependem da severidade e da duração do estresse, do genótipo vegetal, do estágio de desenvolvimento e dos fatores ambientais que impõem o estresse (Deleu *et al.*, 1999; Hanson *et al.*, 1979; Larher *et al.*, 1993; Bray, 1993).

As diferentes respostas ao estresse hídrico são controladas por um grupo de genes com funções diferentes, denominados de genes regulados por estresse osmótico (genes OR) (Deleu *et al.*, 1999), e parte destes genes são ainda regulados por ácido abscísico.

Existem basicamente três classes de genes que são induzidos por estresse hídrico. A primeira classe engloba os genes que apresentam em seus promotores o elemento de resposta ao estresse, mas não apresentam uma sequência de resposta ao ABA (ABRE). A segunda classe é composta pelos genes que, além de apresentarem o elemento de resposta ao estresse, possuem também a sequência ABRE. Estes genes geralmente estão envolvidos com a biossíntese de ABA, e portanto são responsáveis pelo o aumento de sua concentração endógena. Na terceira classe de genes estão aqueles que não apresentam o elemento de resposta ao estresse em seus promotores, mas apresentam a sequência ABRE, e por isso são induzidos pelo aumento da concentração endógena de ABA (Figura 5). A expressão destas

três classes de genes permite à planta produzir proteínas que auxiliem na sua adaptação ao estresse hídrico (Bray, 1993).

Quando uma célula perde água, iniciam-se diversos processos regulatórios para promover o ajuste do metabolismo a esta nova condição. Simultaneamente, o crescimento é inibido e o desenvolvimento é alterado acarretando mudanças da expressão gênica. Acredita-se que estas mudanças tenham como finalidade a promoção de proteção celular (Bray, 1993).

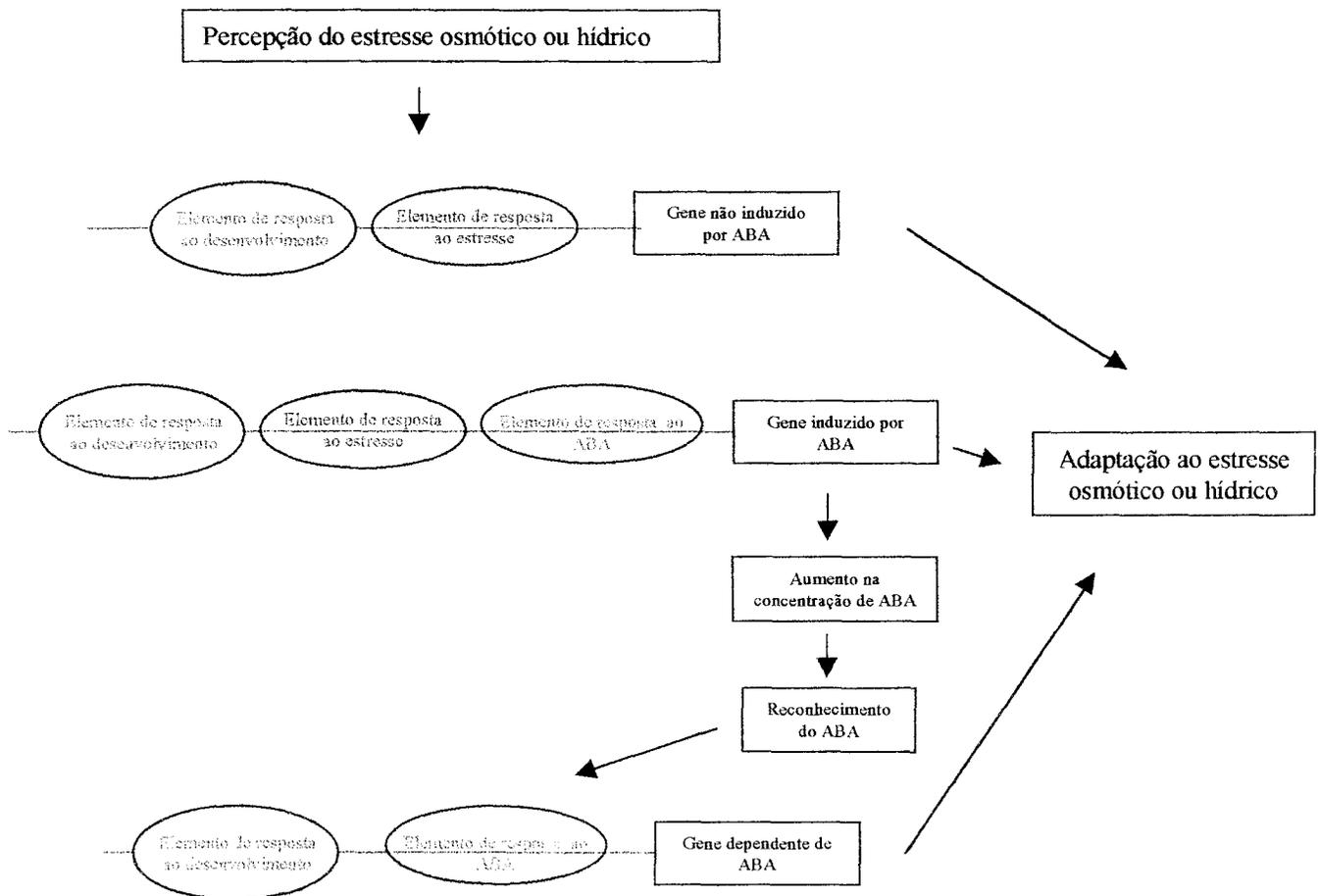


Figura 5: Representação simplificada dos genes induzidos por estresse osmótico ou hídrico. Genes induzidos por ácido abscísico, genes que não são induzidos por ABA e genes dependentes de ABA. Todo o mecanismo se baseia na presença ou ausência de elementos de resposta ao estresse e ao ABA na região promotora destes genes. As proteínas por eles produzidas estão envolvidas de alguma forma na adaptação e tolerância à condição de estresse osmótico ou hídrico, independente de qual seja o mecanismo de indução (modificado a partir de Bray, 1993).

Para a manutenção de um potencial hídrico adequado durante uma situação de déficit de água, é necessário que ocorra na célula um ajuste osmótico que é feito, primeiramente, através da síntese e do acúmulo de moléculas denominadas conjuntamente de osmólitos. Quando se acumulam no citoplasma, estes osmólitos fazem com que a pressão osmótica aumente, mantendo assim tanto o turgor quanto o gradiente de água para dentro da célula (Rhodes e Samaras, 1994).

Osmólitos, solutos compatíveis ou osmoprotetores são compostos não tóxicos às células que se acumulam em concentrações osmoticamente significantes sem afetar o metabolismo. Alguns destes compostos podem também proteger enzimas e membranas contra danos causados por elevadas concentrações de sais, enquanto outros protegem a célula contra as espécies ativas de oxigênio (Nuccio *et al.*, 1999; Rishi *et al.*, 1998).

Existem três grupos de compostos classificados como osmólitos. Os aminoácidos livres, sendo a prolina o mais importante, os álcoois derivados de açúcares (polióis), representados pelo manitol, sorbitol e trealose entre outros, e o último grupo formado por compostos como a glicina betaina (Nuccio *et al.*, 1999).

Dentre os osmoprotetores citados, a prolina é o mais conhecido e estudado. Os genes que codificam proteínas envolvidas em sua biossíntese e metabolismo têm sido isolados em muitas espécies vegetais, o que tem permitido avanços na caracterização da expressão e da função de seus produtos (Yoshida *et al.*, 1997).

Grandes progressos no entendimento dos mecanismos de resposta vegetal a situações de déficit hídrico vêm sendo obtido através do isolamento de genes induzidos por tais condições.

Neste trabalho demonstramos que a expressão do gene LKR/SDH, que codifica uma proteína envolvida no catabolismo de lisina, é induzida quando plântulas de milho são submetidas a estresse salino e aos tratamentos com os fitormônios metil jasmonato e ácido abscísico.

## **II Objetivo**

Analisar a expressão do gene que codifica a principal enzima da via de degradação de lisina, a lisina cetoglutarato redutase/sacaropina desidrogenase (LKR/SDH) em plântulas de milho submetidas aos tratamentos com, cloreto de sódio (NaCl), polietileno glicol (PEG), ácido abscísico (ABA) e metil-jasmonato (MeJa).

### **III Material e métodos**

#### **3.1 Material vegetal**

Sementes do milho híbrido DINA 170 adquiridos da Dow AgroSciences foram descontaminadas com hipoclorito de sódio comercial (1:4) durante 10 minutos e em seguida lavadas 5 vezes com 300 mL de água deionizada. Após a descontaminação as sementes foram colocadas para germinar em papel de germinação autoclavado e úmido, dentro de frascos de vidro contendo 200 mL de água deionizada estéril, trocada todos os dias. A germinação ocorreu durante cinco dias dentro de uma câmara de crescimento, no escuro e à temperatura de 30 °C.

Para o controle positivo dos experimentos de *Northern blot*, utilizou-se sementes da linhagem de milho F352, de plantas com 20 dias após a auto polinização.

#### **3.2 Tratamentos**

As plântulas obtidas no item 3.1 foram submetidas a tratamentos com ácido abscísico, polietileno glicol, metil jasmonato e cloreto de sódio, através de incubação em 200 mL das seguintes soluções:

- Solução contendo 100 µM de ácido abscísico (ABA) racêmico para o tratamento com este fitorregulador;
- Solução contendo 20% de PEG 6000, equivalente a um potencial osmótico de -2,2 MPa, simulando um estresse osmótico;
- Solução contendo 100 µM de metil-jasmonato (MeJa), simulando um tratamento com este fitorregulador;
- Solução de cloreto de sódio (NaCl) 200 mM, simulando um estresse salino;

Nos controles, usou-se apenas água estéril conforme descrito em trabalhos anteriores (Merkouropoulos *et al.*, 1999; Herde *et al.*, 1996) e todos tratamentos foram feitos sob luz constante.

O material vegetal (parte aérea e raízes) foi coletado às 0, 3, 6, 12 e 24 horas após a incubação com as soluções citadas acima. O material foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado à - 70 °C para análise posterior.

Como amostra para o controle positivo dos experimentos foi usado endosperma de semente de milho com 20 DAP.

### **3.3 Extração e quantificação do RNA total**

O RNA total foi isolado a partir da parte aérea e das raízes das plântulas de milho utilizando-se o reagente Trizol<sup>®</sup> de acordo com as especificações do fabricante (Life Technologies Inc.). A concentração do RNA obtido foi determinada por espectrofotometria, usando-se comprimento de onda de 260 nm, sendo  $Abs_{260nm} = 1$ , equivale a 40 µg/mL de RNA em solução.

### **3.4 Northern blot**

Quinze microgramas do RNA total de cada amostra foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% contendo formaldeído como agente desnaturante. O RNA foi transferido para uma membrana de nylon Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham Biosystems) conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989). Após a transferência as membranas foram incubadas por 2 horas à 80 °C, para fixação do RNA. A pré-hibridação foi feita com 10 mL da solução Express Hyb<sup>™</sup> (Clontech) por 30 minutos à 65 °C, e a hibridação com 10 mL da mesma solução contendo a sonda marcada radioativamente e desnaturada, por 1 hora à 65 °C.

A sonda foi obtida a partir de um clone de cDNA de LKR/SDH disponível em nosso laboratório que, após a clivagem com a enzima de restrição *Bam*HI, produziu um fragmento de aproximadamente 650 pb, referente à parte do domínio de LKR. A marcação radioativa da sonda com [ $\alpha^{32}P$ ] dCTP foi realizada com o kit comercial Megaprime (Amersham Biosystems) e purificada em coluna G-50 (Pharmacia).

Após a hibridação, as membranas foram lavadas por 40 minutos à temperatura ambiente com uma solução de SSC 0,1x e SDS 0,1% à 50 °C.

As membranas foram expostas em IP Bas-MS por 24 horas, a leitura do IP e as quantificações foram feitas no aparelho *Phosphorimager* FLA-3000G (Fujifilm-Japão) utilizando-se os programas “*ImageGauge*” e “*ArrayGauge*” respectivamente.

### **3.5 Normalização das membranas**

A intensidade dos sinais referentes ao RNA ribossomal dos géis de agarose usados para transferência do RNA total foram quantificadas no aparelho *Eagle eye II* com o programa “*Eagle Sight*”. Estas quantificações são necessárias para garantir que uma provável alteração na expressão de um gene reflita a sua indução e não diferenças nas quantidades de RNA aplicadas. Estas intensidades foram utilizadas para normalizar os sinais obtidos nos *Northern blots* referentes a hibridação com o RNA mensageiro da LKR/SDH.

Após a correção nas diferenças de concentrações, o nível de expressão do gene foi calculado através da razão entre o valor referente à intensidade do sinal da amostra tratada sobre o valor do seu respectivo controle, no mesmo tempo de tratamento.

### **3.6 Extração de proteína**

Para as medidas de atividade enzimática foram feitas extrações de proteína total da parte aérea e das raízes das plântulas. O tecido foi macerado em solução tampão contendo fosfato de sódio 25 mM pH 7,4, 1 mM de DTT, 1 mM de EDTA e 5 mM de benzamidina. O macerado foi centrifugado a 12.000g por 30 minutos à 4°C e o sobrenadante, contendo o extrato de proteína total, foi usado nos ensaios de atividade enzimática. A concentração de proteína total foi medida conforme descrito por Bradford (1976).

### **3.7 Ensaio de atividade enzimática**

A atividade de LKR foi medida em espectrofotômetro, acompanhando-se a formação do NADP produzido durante a reação, que ocorre em meio contendo 20 mM de L-lisina, 10 mM de  $\alpha$ -cetoglutarato (solução 100 mM preparada separadamente e

neutralizada com hidróxido de potássio) e 0,1 mM de NADPH em 150 mM de tampão Tris-HCl pH 7,4 à 30°C. A reação é iniciada adicionando-se de 0,04 a 1 mg de proteína total em um volume final de 0,6 mL (Kemper, *et al.*, 1999).

A atividade de SDH também foi medida em espectrofotômetro detectando-se a reação de redução de NAD<sup>+</sup> à 30°C. A reação enzimática ocorre em uma mistura de reação contendo 2 mM de sacaropina e 2 mM de NAD<sup>+</sup> em 100 mM de tampão Tris-HCl pH 8,5. A reação é iniciada adicionando-se de 0,04 a 1 mg de proteína total em um volume final de 0,6 mL (Kemper, *et al.*, 1999).

Tanto a oxidação de NADPH quanto a redução de NAD<sup>+</sup> foram monitoradas a 340 nm num espectrofotômetro Beckman modelo DU-65. Uma unidade de atividade da enzima é definida como 1 nmol de NADPH oxidado ou NAD<sup>+</sup> reduzido por minuto à 30°C.

Nas reações controle não se coloca o substrato específico da enzima, ou seja a reação controle de atividade de LKR contém 10 mM de  $\alpha$ -cetogluturato (solução 100 mM preparada separadamente e neutralizada com hidróxido de potássio) e 0,1 mM de NADPH em 150 mM de tampão Tris-HCl pH 7,4 à 30°C, e de 0,04 a 1 mg de proteína total em um volume final de 0,6 mL. Para SDH coloca-se na reação 100 mM de tampão Tris-HCl pH 8,5 de 0,04 a 1 mg de proteína total em um volume final de 0,6 mL.

## **IV Resultados**

### **4.1 Expressão da LKR/SDH na parte aérea das plântulas de milho**

As análises das hibridações das membranas contendo RNA total extraído da parte aérea das plântulas de milho com a sonda da LKR revelaram, que os tratamentos com os fitormônios ácido abscísico (ABA) e metil-jasmonato (MeJa) promoveram a indução da expressão do gene da LKR/SDH (Figuras 6A e 7A).

Na parte aérea das plântulas tratadas com ácido abscísico foi verificado aumento na expressão gênica da LKR/SDH 6 horas após o início do tratamento, neste tempo, a indução foi máxima, aproximadamente 111 vezes o valor do controle, quando comparada com os demais tempos. Em 12 horas de tratamento a expressão diminuiu para 63 vezes em relação o controle e baixou para 28 vezes superior ao controle em 24 horas após o início do tratamento (Figura 6C).

O perfil da transcrição deste gene na parte aérea das plântulas tratadas com MeJa foi um pouco diferente. Às 3 horas do início do tratamento não havia expressão aparente, ou seja, o valor da intensidade relativa do referente a amostra tratada era igual ao da amostra controle. 6 horas após a incubação inicial foi então verificada a indução da transcrição, que mostrou ser 64 vezes maior que o controle. Porém o pico da cinética de expressão foi observado no tempo de 12 horas de tratamento, neste momento o valor obtido em relação ao controle mostrava-se 89 vezes superior. Em 24 horas a expressão chegou encontrada era 6,5 vezes o valor do obtido no controle (Figura 7C).

Os resultados das hibridações das membranas contendo RNA total extraído da parte aérea das plântulas de milho com a sonda da LKR revelaram que os tratamentos com polietileno glicol (PEG) e cloreto de sódio (NaCl) não provocaram alteração significativa na transcrição do gene durante tratamento (Figuras 8A e 9A).

Isto significa que as análises da transcrição do gene LKR/SDH em consequência destes dois tratamentos mostraram que, durante as 24 horas os valores de expressão encontrados para as amostras tratadas era igual ao encontrado para as amostras controle (Figura 8C e 9C).

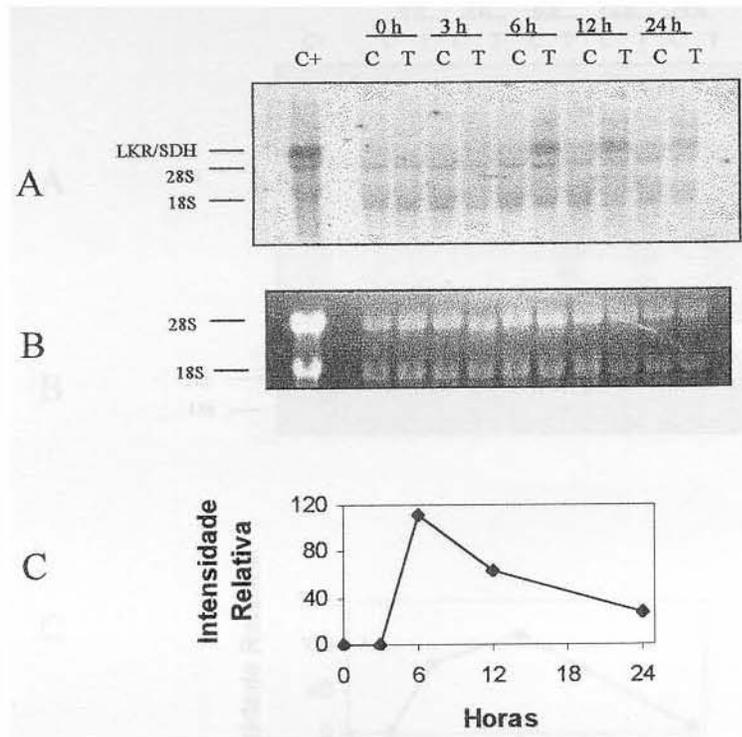


Figura 6: Análise da expressão do gene LKR/SDH em plântulas de milho tratadas com ABA. (A) hibridação do RNA total da parte aérea das plântulas com a sonda de LKR. C amostras controle (incubadas em água), T amostras tratadas (incubadas em uma solução de 100  $\mu$ M de ABA), coletadas em 0, 3, 6, 12 e 24 horas após a incubação. C+ controle positivo, RNA total de endosperma de milho com 20 DAP (dias após a polinização). (B) gel de agarose corado com brometo de etídio. O gráfico (C) mostra os níveis de expressão das amostras tratadas em relação aos seus respectivos controles.

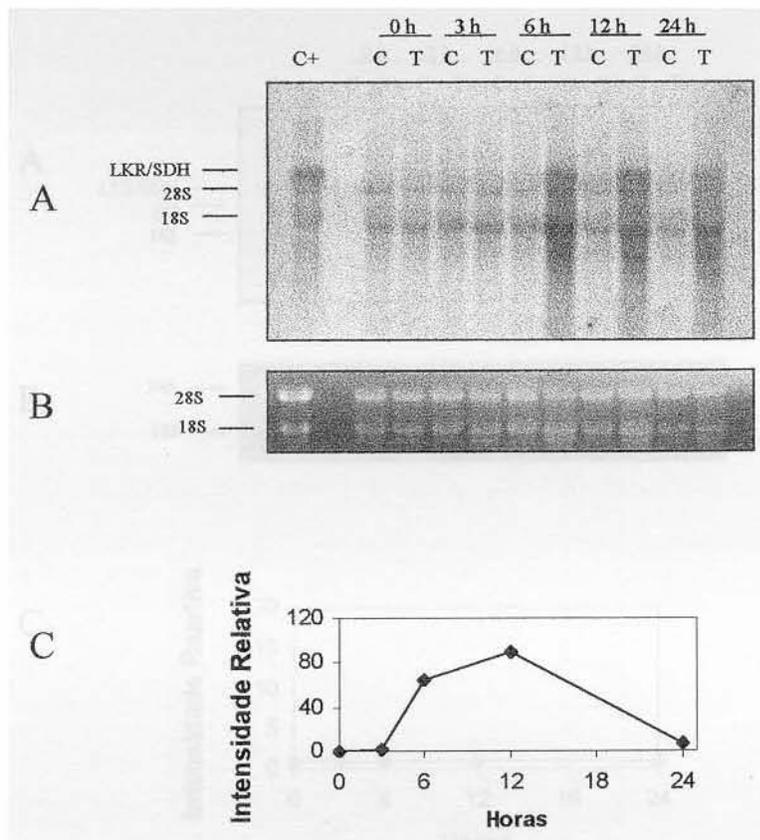


Figura 7: Análise da expressão do gene LKR/SDH em plântulas de milho tratadas com metil jasmonato. (A) hibridação do RNA total da parte aérea das plântulas com a sonda de LKR. C amostras controle (incubadas em água), T amostras tratadas (incubadas em uma solução de 100  $\mu$ M de metil jasmonato), coletadas em 0, 3, 6, 12 e 24 horas após a incubação. C+ controle positivo, RNA total de endosperma de milho com 20 DAP (dias após a polinização). (B) gel de agarose corado com brometo de etídio. O gráfico (C) mostra os níveis de expressão das amostras tratadas em relação aos seus respectivos controles

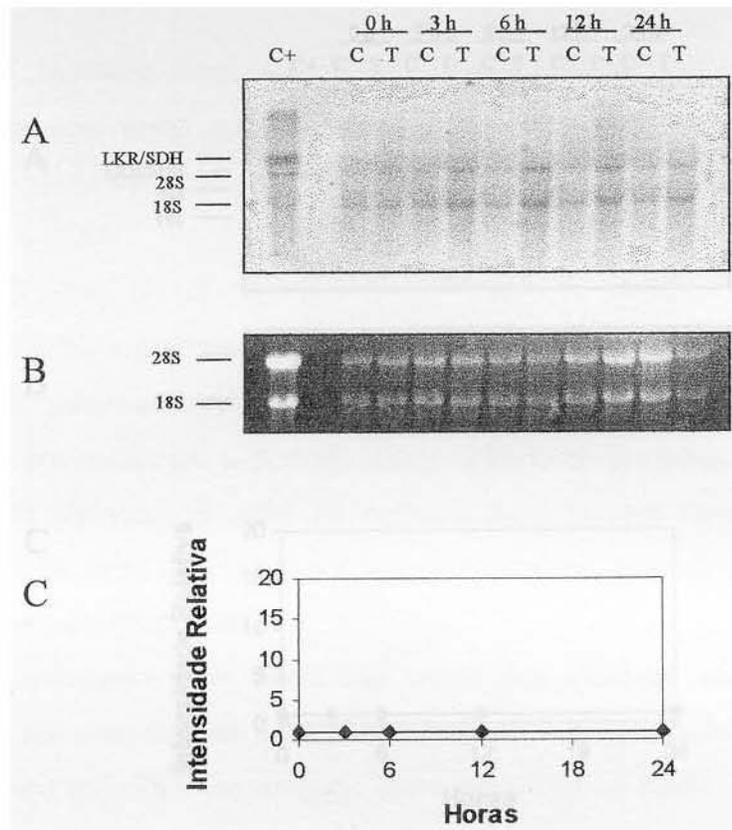


Figura 8: Análise da expressão do gene LKR/SDH em plântulas de milho tratadas com polietileno glicol. (A) hibridação do RNA total da parte aérea das plântulas com a sonda de LKR. C amostras controle (incubadas em água), T amostras tratadas (incubadas em uma solução de polietileno glicol 20%), coletadas em 0, 3, 6, 12 e 24 horas após a incubação. C+ controle positivo, RNA total de endosperma de milho com 20 DAP (dias após a polinização). (B) gel de agarose corado com brometo de etídio. O gráfico (C) mostra os níveis de expressão das amostras tratadas em relação aos seus respectivos controles.

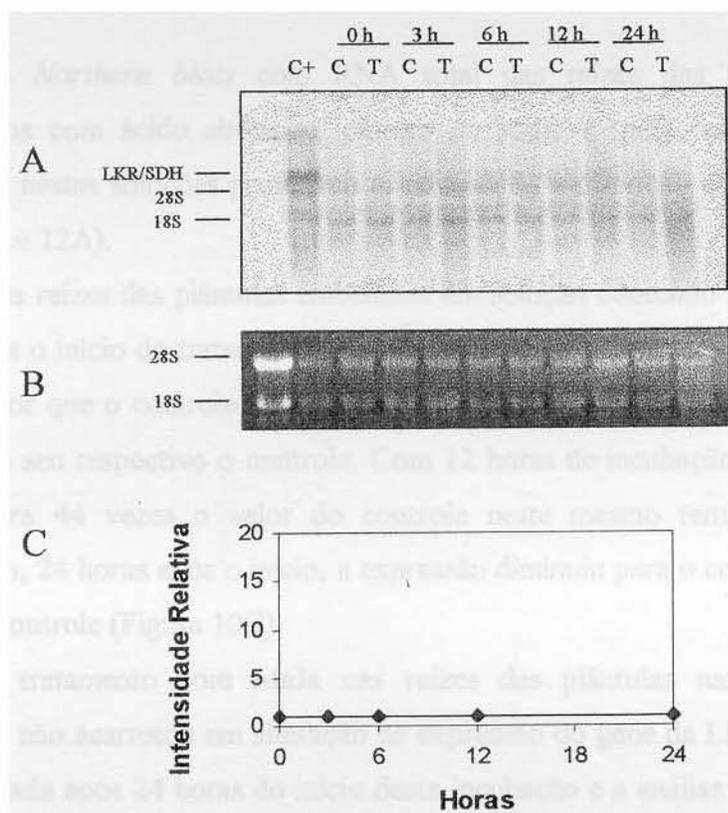


Figura 9: Análise da expressão do gene LKR/SDH em plântulas de milho tratadas com cloreto de sódio. (A) hibridação do RNA total da parte aérea das plântulas com a sonda de LKR. C amostras controle (incubadas em água), T amostras tratadas (incubadas em uma solução 200mM de NaCl), coletadas em 0, 3, 6, 12 e 24 horas após a incubação. C+ controle positivo, RNA total de endosperma de milho com 20 DAP (dias após a polinização). (B) gel de agarose corado com brometo de etídio. O gráfico (C) mostra os níveis de expressão das amostras tratadas em relação aos seus respectivos controles.

## 4.2 Expressão da LKR/SDH nas raízes das plântulas de milho

Os *Northern blots* com RNA total das raízes das plântulas submetidas aos tratamentos com ácido abscísico, cloreto de sódio e metil jasmonato mostraram que a incubação nestas soluções promoveu a indução da transcrição do gene LKR/SDH (Figuras 10A, 11A e 12A).

Nas raízes das plântulas embebidas em solução contendo ABA verificou-se que três horas após o início do tratamento já havia indução da transcrição do gene e que esta era 15 vezes maior que o controle. O pico de expressão foi observado em 6 horas e era 49 vezes maior que seu respectivo o controle. Com 12 horas de incubação a expressão diminuiu um pouco para 44 vezes o valor do controle neste mesmo tempo, no último tempo do tratamento, 24 horas após o início, a expressão diminuiu para o correspondente a 16 vezes o valor do controle (Figura 10C).

O tratamento com MeJa nas raízes das plântulas nas primeiras 12 horas de incubação não acarretou em alteração na expressão do gene da LKR/SDH. Uma indução só foi observada após 24 horas do início desta incubação e a análise desta mostrou que era 24 vezes maior que seu respectivo controle (Figura 11C).

O estresse salino, imposto através da incubação das plântulas em solução contendo cloreto de sódio, não promoveu nenhuma modificação da expressão gênica de LKR/SDH durante as 12 horas iniciais de tratamento, uma indução significativa da expressão do gene, ou seja 12 vezes maior o controle, ocorreu em 24 horas de tratamento (Figura 12C).

O tratamento das plântulas com polietileno glicol não refletiu em alterações na expressão do gene que codifica a LKR/SDH, como pode ser verificado na Figura 13. Durante as 24 horas de tratamento a quantidade de transcritos deste gene nas raízes da plântulas tratadas foi similar a quantidade encontrada nas raízes das plântulas incubadas em água (controle).

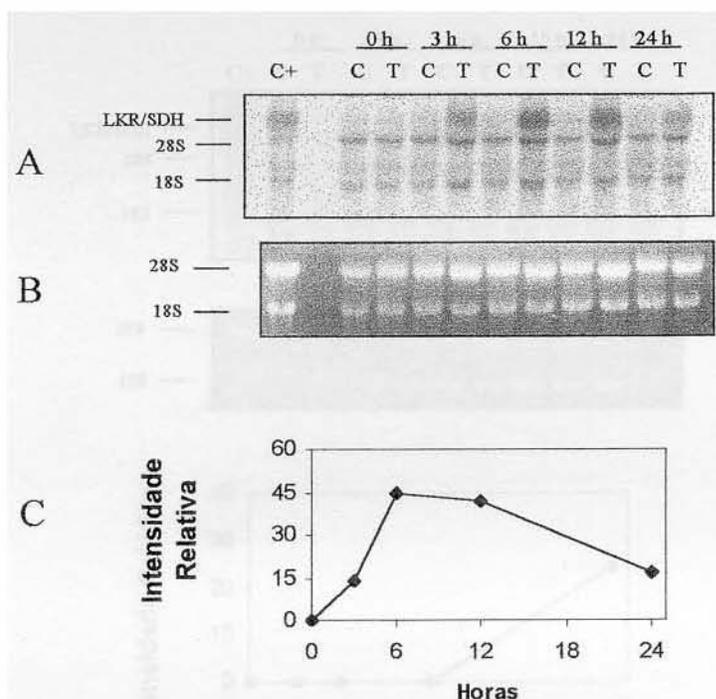


Figura 10: Análise da expressão do gene LKR/SDH em plântulas de milho tratadas com ABA. (A) hibridação do RNA total da raiz das plântulas com a sonda de LKR. C amostras controle (incubadas em água), T amostras tratadas (incubadas em uma solução 100  $\mu$ M de ABA), coletadas em 0, 3, 6, 12 e 24 horas após a incubação. C+ controle positivo, RNA total de endosperma de milho com 20 DAP (dias após a polinização). (B) gel de agarose corado com brometo de etídio. O gráfico (C) mostra os níveis de expressão das amostras tratadas em relação aos seus respectivos controles.

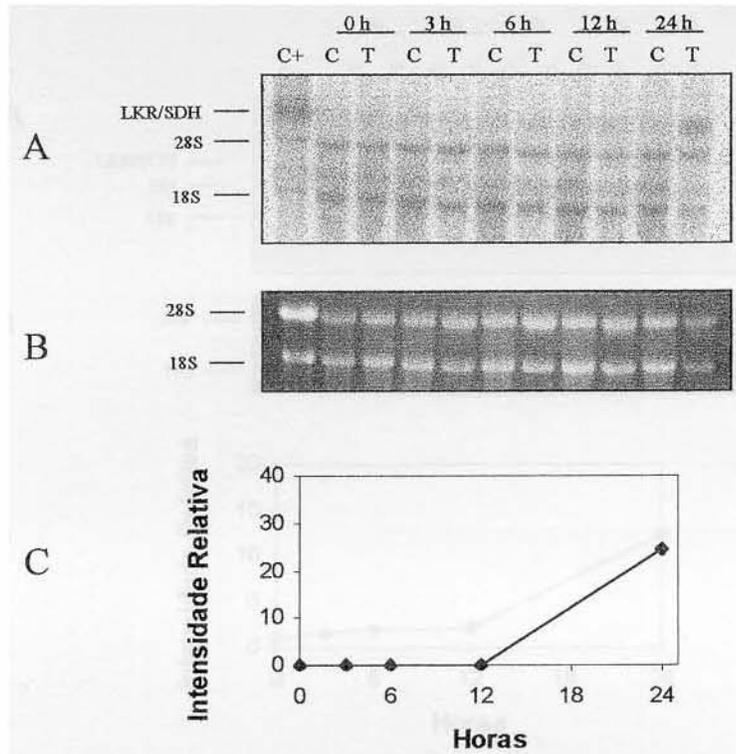


Figura 11 Análise da expressão do gene LKR/SDH em plântulas de milho tratadas com metil jasmonato. (A) hibridação do RNA total da raiz das plântulas com a sonda de LKR. C amostras controle (incubadas em água), T amostras tratadas (incubadas em uma solução 100  $\mu$ M de metil jasmonato), coletadas em 0, 3, 6, 12 e 24 horas após a incubação. C+ controle positivo, RNA total de endosperma de milho com 20 DAP (dias após a polinização). (B) gel de agarose corado com brometo de etídio. O gráfico (C) mostra os níveis de expressão das amostras tratadas em relação aos seus respectivos controles.

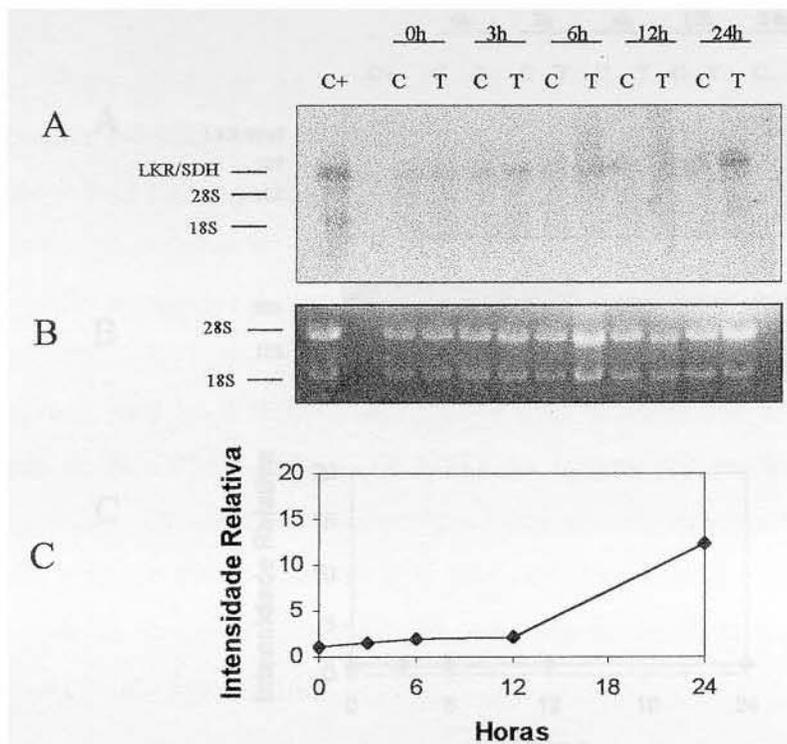


Figura 12 Análise da expressão do gene LKR/SDH em plântulas de milho tratadas com NaCl. (A) hibridação do RNA total da raiz das plântulas com a sonda de LKR. C amostras controle (incubadas em água), T amostras tratadas (incubadas em uma solução 200 mM de NaCl), coletadas em 0, 3, 6, 12 e 24 horas após a incubação. C+ controle positivo, RNA total de endosperma de milho com 20 DAP (dias após a polinização). (B) gel de agarose corado com brometo de etídio. O gráfico (C) mostra os níveis de expressão das amostras tratadas em relação aos seus respectivos controles.

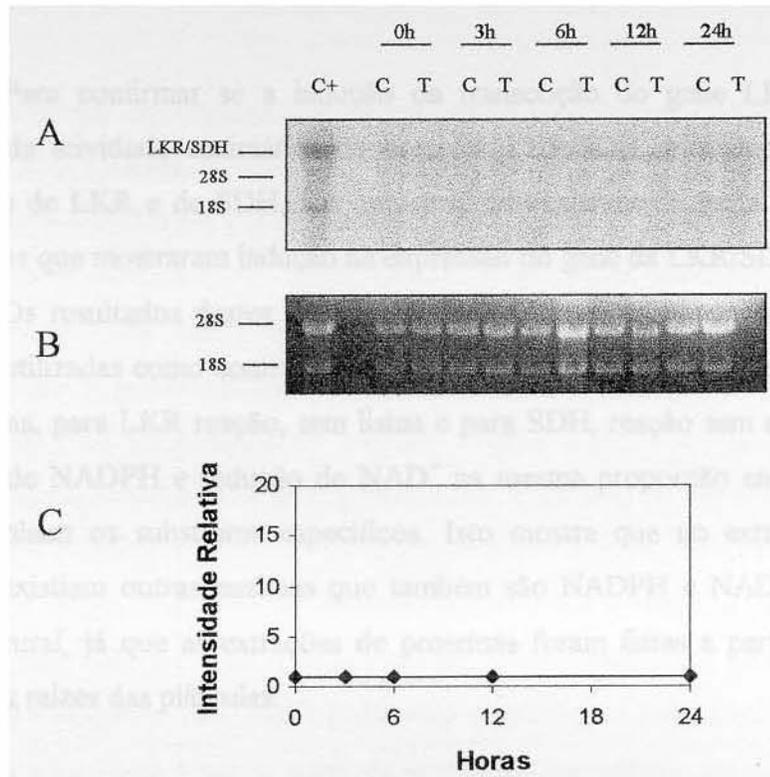


Figura 13 Análise da expressão do gene LKR/SDH em plântulas de milho tratadas com polietileno glicol. (A) hibridação do RNA total da raiz das plântulas com a sonda de LKR. C amostras controle (incubadas em água), T amostras tratadas (incubadas em uma solução de polietileno glicol 20%), coletadas em 0, 3, 6, 12 e 24 horas após a incubação. C+ controle positivo, RNA total de endosperma de milho com 20 DAP (dias após a polinização). (B) gel de agarose corado com brometo de etídio. O gráfico (C) mostra os níveis de expressão das amostras tratadas em relação aos seus respectivos controles.

### **4.3 Atividade Específica de LKR e SDH**

Para confirmar se a indução da transcrição do gene LKR/SDH acarretou no aumento da atividade enzimática da proteína LKR/SDH, buscamos medir as atividades específicas de LKR e de SDH, nas amostras provenientes da parte aérea e das raízes dos tratamentos que mostraram indução na expressão do gene da LKR/SDH.

Os resultados destes experimentos não foram satisfatórios porque as reações de atividade utilizadas como controle, ou seja, onde não se acrescenta os substratos específicos das enzimas, para LKR reação, sem lisina e para SDH, reação sem sacaropina, verificamos oxidação de NADPH e redução de  $\text{NAD}^+$  na mesma proporção encontrada nas amostras que continham os substratos específicos. Isto mostra que no extrato bruto de proteína utilizado existiam outras enzimas que também são NADPH e  $\text{NAD}^+$  dependentes. O que parece natural, já que as extrações de proteínas foram feitas a partir de tecidos da parte aérea e das raízes das plântulas.

## V Discussão

Ainda que os mecanismos bioquímicos e moleculares da regulação do catabolismo de lisina não estejam totalmente elucidados e que existam ainda poucas informações disponíveis a respeito do papel fisiológico da LKR/SDH e dos produtos de suas reações, alguns autores (Arruda *et al.*, 2000; Moulin *et al.*, 2000; Galili *et al.*, 2001) sugerem que esta via bioquímica esteja sujeita a uma regulação complexa, envolvendo alterações transcricionais e pós-transcricionais. Estes autores acreditam num provável envolvimento desta via com os mecanismos de resposta vegetal a situações de estresses. Assim sendo, neste trabalho demonstramos pela primeira vez a indução da expressão do gene LKR/SDH em plântulas de milho submetidas aos tratamentos com ABA, MeJa e NaCl.

Nos tratamentos com os fitorreguladores ABA e MeJa, a indução da expressão do gene foi observada em toda a planta, ou seja, tanto nas raízes quanto na parte aérea. No entanto, o tratamento com NaCl promoveu alteração da expressão da LKR/SDH somente nas raízes e na parte aérea o perfil de expressão encontrado foi idêntico ao das plântulas controle. Neste trabalho foi realizado também um tratamento com uma solução de PEG, porém não se verificou nenhuma modificação na expressão do gene na parte aérea nem nas raízes das plântulas submetidas a este tratamento.

Este resultado, referente ao tratamento com PEG, contrasta com o resultado que Deleu e colaboradores (1999) obtiveram trabalhando com discos foliares de canola (*Brassica napus*) submetidos a estresse osmótico, também, por incubação em solução de PEG. Estes pesquisadores observaram pela primeira vez que nesta condição, o gene LKR/SDH teve sua expressão induzida. Como as soluções de PEG usadas no presente trabalho e no trabalho citado, têm o mesmo potencial osmótico, sugerimos que o fato de nossos resultados contrastarem com os destes pesquisadores, pode ser consequência das diferenças naturais existentes entre plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, ou ainda ser consequência do material vegetal usado em cada trabalho, no nosso trabalho, tratamos e analisamos a plântula inteira (raiz e parte aérea) ao passo que no referido trabalho foram usados somente discos foliares.

É possível que o tratamento com NaCl só tenha afetado a expressão do gene nas raízes, pelo fato delas estarem embebidas na solução salina. Visto que a incubação em

solução hipertônica de NaCl envolve perda de água do tecido para o meio, desta forma parece natural que as raízes percebam e respondam primeiramente aos efeitos deste tratamento.

Nos últimos anos, vários estudos foram feitos com o intuito de compreender quais são e como ocorrem as alterações bioquímicas e fisiológicas nos vegetais submetidos à tratamentos, que simulem situações de estresse hídrico (frio, seca, alta salinidade). Com isso, surgiu também a necessidade de entender como os fitorreguladores estão envolvidos nos processos de resposta a estas condições.

Muitos esforços tem sido feito para isolar genes induzidos em condições de estresse, pois sabe-se que as mudanças na expressão gênica são fundamentais para que ocorram as respostas no vegetal, e que genes expressos durante estas situações são prováveis promotores de tolerância (Bray, 1993). Porém, devido à sua complexidade, os processos de regulação e sinalização que controlam a expressão de genes durante um estresse ainda não foram esclarecidos, mas parece que estes processos estão conectados a uma mesma via ou em vias similares de regulação e sinalização, o que é evidenciado pelo envolvimento do ABA e de jasmonatos na indução de genes sabidamente induzidos por diferentes estresses (Sembdner e Parthier, 1993).

As plantas respondem ao estresse hídrico através de mudanças fisiológicas e no desenvolvimento desencadeadas por alterações no volume, na forma da membrana e nas concentrações dos solutos celulares, bem como o rompimento do gradiente de potencial hídrico, a perda de turgor e a desnaturação de proteínas, entre outras (Yoshihara *et al.*, 1997). Porém, nestas condições, a síntese de osmólitos parece ser um dos fatores cruciais à adaptação à falta de água no meio.

A prolina é o osmoprotetor mais comum em plantas desidratadas, seu acúmulo é consequência da ativação da sua biossíntese e da inativação de sua degradação.

Nos vegetais, a síntese de L-prolina ocorre numa via metabólica conhecida como  $\Delta^1$ pirrolina-5-carboxilato (P5C), através das atividades enzimáticas da pirrolina-5-carboxilato sintase (P5CS) e da pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR). Nesta via, o L-glutamato é o precursor. A L-prolina é metabolizada em L-glutamato na mesma via P5C, pela atividade de duas enzimas, a prolina desidrogenase (ProDH) e a  $\Delta^1$ pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH) (Figura 14).

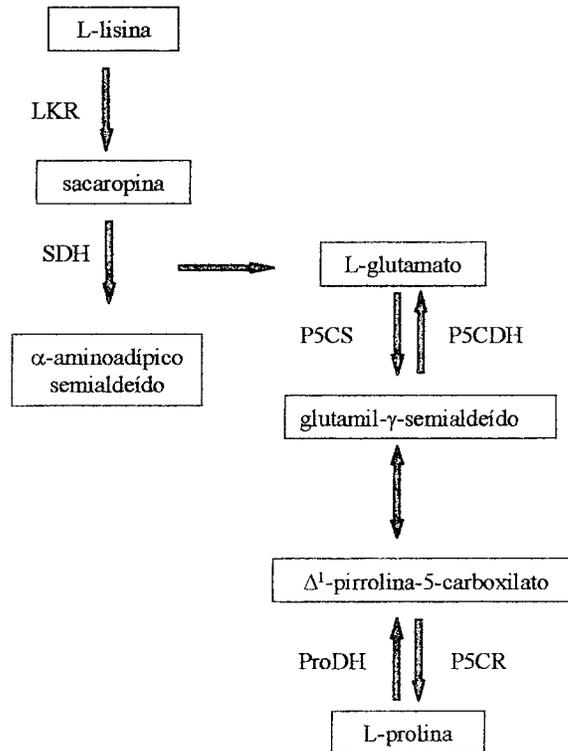


Figura 14: Vias metabólicas de conversão de L-lisina a L-prolina. A via mostra como a L-lisina é convertida em glutamato pelas atividades de Lisina Cetoglutarato Redutase (LKR) e Sacaropina Desidrogenase (SDH). Em seguida, como o L-glutamato é convertido em L-prolina através das atividades de Pirrolina-5-Carboxilato Redutase (P5CR) e Pirrolina-5-Carboxilato Sintase (P5CS), a L-prolina pode ser metabolizada em L-glutamato pelas atividades das enzimas Prolina Desidrogenase (ProDH) e Pirrolina-5-Carboxilato Desidrogenase (P5CDH).

Em caso de desidratação, a expressão de P5CS é fortemente induzida e a expressão de P5CSDH é inibida, porém, ocorrendo a re-hidratação, a expressão de P5CSDH é induzida e da P5CS é reprimida. Sendo assim, a concentração de prolina durante o estresse hídrico é consequência da regulação transcricional destes dois genes (Yoshida, *et al.*, 1997).

Em 1970, Sodek e Wilson demonstraram, através de experimentos de lisina marcada com  $^{14}\text{C}$ , que este aminoácido é convertido em glutamato que é posteriormente convertido em prolina conforme apresentado na Figura 14. Agora, verificamos neste trabalho, que o gene que codifica a principal enzima responsável pela degradação de lisina, teve sua expressão induzida pelo tratamento com solução salina (NaCl) e pelos tratamentos com os fitorreguladores ABA e MeJa.

A consequência fisiológica da indução do sistema LKR/SDH em uma condição de estresse hídrico e pelo tratamento com ABA e MeJa ainda não é conhecida, mas é possível que esteja relacionada com a necessidade celular de controlar a concentração de lisina livre. Além de elevadas concentrações de lisina comprometerem a síntese de outros aminoácidos essenciais (Azevedo *et al.*, 1997), este aminoácido representa um osmólito não compatível com as células durante o estresse, seu acúmulo inibe a ação de algumas enzimas e altera a estabilização de proteínas contra a desnaturação decorrente do estresse (Rishi *et al.*, 1998).

Considerando-se que a proteólise osmo-induzida durante um estresse pode provocar um inconveniente aumento na concentração celular de lisina livre, a indução da transcrição do gene LKR/SDH durante uma condição de estresse osmótico pode contribuir para a adaptação a esta situação. Produzindo-se mais enzima LKR/SDH é possível controlar eventuais excessos na concentração de lisina livre (Moulin *et al.*, 2000).

Os principais produtos da degradação de lisina são o ácido  $\alpha$ -aminoadípico- $\delta$ -semialdeído (AASA) e o glutamato. A via da sacaropina é a única entre as vias de degradação de aminoácidos que gera, no mínimo, duas moléculas de glutamato por molécula de lisina oxidada (Arruda *et al.*, 2000).

O AASA pode ser convertido a ácido pipecólico ou a  $\alpha$ -aminoadipato, este último podendo ser degradado e formar acetil-CoA (Figura 2). O ácido pipecólico ainda não teve sua função caracterizada bioquimicamente, mas existem indícios de que ele funcione como uma fonte de reserva de nitrogênio, especialmente quando as amins estão em baixas concentrações nas células (Moulin *et al.*, 2000). Além disso, há evidências de que o ácido pipecólico funcione como um osmólito, seu acúmulo tendo sido detectado juntamente com o acúmulo de prolina em soja (*Glycine max*) submetida a estresse hídrico (Fukutoku e Yamada, 1981).

Em animais, o ácido glutâmico, o segundo produto da reação catalisada pela LKR/SDH, está envolvido com a comunicação entre as células no sistema nervoso central, além de ser necessário para que as sinapses neuronais se formem adequadamente durante o desenvolvimento (Verhage *et al.*, 2000). Os vegetais também apresentam receptores de glutamato com grande similaridade aos receptores de células animais (Lam *et al.*, 1998). É provável que durante a evolução, o glutamato tenha sido preservado como molécula

biologicamente ativa, já que apresenta funções relacionadas com desenvolvimento, comunicação celular e com as respostas à mudanças ambientais (Arruda *et al.*, 2000).

O envolvimento do glutamato com a tolerância e adaptação ao estresse hídrico pode ser compreendido pelo fato deste aminoácido servir como precursor de três importantes metabólitos relacionados com estresse, o ácido  $\gamma$ -aminobutírico, a arginina e a prolina (Figura 15). O ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) é uma molécula de sinalização de estresse (Baum, *et al.*, 1996), a arginina é precursora de compostos relacionados ao estresse, como as poliaminas e o óxido nítrico (Klessig *et al.*, 2000) e a prolina, um forte osmólito (Hare e Cress, 1997; Nuccio *et al.*, 1999).

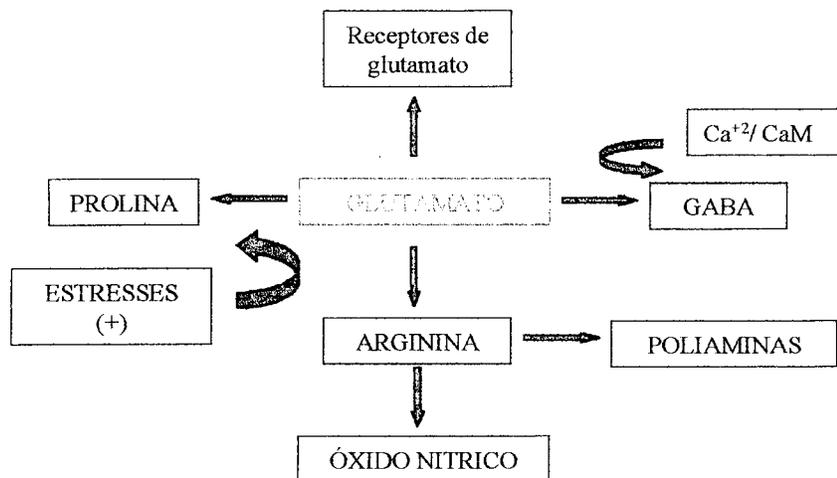


Figura 15: Vias de conversão do glutamato em vários metabólitos relacionados com estresse. A conversão do glutamato em prolina, um forte osmólito, ocorre primeiramente em resposta a uma situação de estresse. O glutamato é também convertido em duas moléculas de sinalização, o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) numa reação catalisada por  $Ca^{+2}$  e calmodulina (CaM), e em óxido nítrico, via arginina. O glutamato também age como estimulador dos receptores de glutamato. (modificado a partir de Galili *et al.*, 2001).

O glutamato, uma molécula importante para síntese de prolina, é um dos produtos da via de degradação de lisina, portanto, é interessante sugerir que a indução da expressão do gene LKR/SDH, que codifica a principal enzima desta rota metabólica, por tratamentos com MeJa, NaCl e ABA, esteja relacionada à demanda de glutamato para síntese de osmoprotetores, principalmente a prolina.

Vale ressaltar ainda que a análise da região promotora de alguns genes, identificados como induzidos por ABA e MeJa, mostrou a presença de um domínio comum

e aparentemente responsável pela resposta a estes hormônios. Este domínio conhecido como G-box é um sítio de ligação a fatores de transcrição do tipo bZIP (Chandler e Robertson, 1994; Creelman e Mullet, 1997).

O gene LKR/SDH também apresenta em seu promotor um sítio G-box (Figura 3), no qual se liga o fator de transcrição, do tipo bZIP, Opaco2, responsável pela regulação da transcrição do gene que codifica a enzima LKR/SDH (Kemper *et al.*, 1999). Desta forma, o fato da transcrição deste gene ter sido induzida por MeJa, ABA e NaCl, pode ter sido consequência da ativação de seu fator de transcrição (Opaco2) por estes tratamentos, que com isso se ligou ao promotor do gene da LKR/SDH, promovendo assim a sua transcrição. Havendo mais moléculas ativas da enzima LKR/SDH, deverá ocorrer um aumento na degradação de moléculas de lisina livre e, com isso, um aumento na concentração de glutamato que poderá ser aproveitado para a biossíntese de prolina, uma molécula fundamental na proteção contra estresse hídrico e no ajuste osmótico da célula. Somente uma análise bioquímica mais detalhada das plântulas submetidas aos tratamentos, citados acima, comparada àquela de plântulas controle poderia validar esta hipótese.

A indução da expressão do gene LKR/SDH em consequência dos tratamentos acima citados, não é suficiente para afirmar que o produto deste gene confira à planta tolerância e adaptação a uma situação de estresse. Mas é um forte indício de sua importância e de sua participação na resposta aos diferentes tipos de estresse. A confirmação de que o aumento na expressão acarretou também no aumento das atividades específicas de LKR e SDH, conforme já foi descrito por outros autores para canola (*Brassica napus*) (Moulin *et al.*, 2000), juntamente com análises de conteúdo de prolina no extrato de proteína de plântulas tratadas e não tratadas poderia auxiliar na comprovação do envolvimento deste gene com resposta e tolerância vegetal a alguns tipos de estresse.

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho surgem os primeiros indícios da relação entre o catabolismo de lisina e os mecanismos de resposta e tolerância vegetal ao déficit hídrico. A importância de estudos, como este aqui apresentado, é ajudar a entender como os vegetais percebem mudanças osmóticas em seus ambientes e como isso induz alterações na expressão de genes específicos e de seus produtos. Assim a caracterização e a identificação de novos genes induzidos é extremamente relevante, pois permitirá um maior entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta do vegetal a alguns tipos de estresse.

## **VI Conclusões**

- A incubação de plântulas de milho em solução contendo ácido abscísico promove a indução da transcrição do gene da LKR/SDH tanto nas raízes como na parte aérea das plântulas.
- O tratamento de plântulas de milho com o fitormônio metil jasmonato também é capaz de desencadear a indução da expressão do gene LKR/SDH tanto nas raízes como na parte aérea das plântulas.
- O estresse salino em plântulas de milho alterou a transcrição do gene LKR/SDH, induzindo sua expressão nas raízes das plântulas tratadas.
- O estresse osmótico, imposto pela incubação das plântulas de milho em solução contendo PEG, não alterou a transcrição do gene que codifica a enzima LKR/SDH, nas raízes e nem na parte aérea.

## **VII Perspectivas**

- Purificar a enzima LKR/SDH a partir do extrato de proteína total das amostras que apresentaram indução da transcrição do gene LKR/SDH, e medir as atividades específicas de LKR e de SDH.
- Analisar o conteúdo de prolina do extrato de proteína total das plântulas tratadas e das plântulas controle, afim de verificar se houve alguma alteração na concentração deste osmólito nas amostras submetidas aos tratamentos com PEG, MeJa, ABA e NaCl.

## VIII Referências bibliográficas

- Arruda , P. e Silva, W.** (1979). Amino Acid Composition of Vascular Sap of Maize Ear Penduncle. *Phytochemistry* **18**, 409-410.
- Arruda, P. e da Silva, W.J.** (1983). Lysine-Ketoglutarate Reductase Activity in Maize: Its Possible Role in Lysine Metabolism of Developing Endosperm. *Phytochemistry* **22**, 2687-2689
- Arruda, P.; Kemper, E.L.; Papes, F. e Leite, A.** (2000). Regulation of Lysine Catabolism in Higher Plants .*Trends Plant Science.* **5**, 324-330.
- Azevedo, R.A.; Arruda, P.; Turner, W.P. e Lea, P.J.** (1997). The Biosynthesis and Metabolism of the Aspartate Derived Amino Acids in Higher Plants. *Phytochemistry* **46**, 395-419.
- Baum, G.; Lev-Yadun, S.; Fridmann, Y.; Arazi, T.; Katsenelson, H.; Zik, M. e Fromm, H.** (1996). Calmodulin Binding to Glutamate Decarboxylase Is Required for Regulation of Glutamate and GABA Metabolism and Normal Development in Plants. *EMBO J.* **15**, 2988-2996.
- Blée, E.** (1998). Phytooxipilins and Plant Defense Reactions. *Prog. Lipid. Res.* **37**, 33-72.
- Bradford, M.** (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Proteins Utilizing the Principles of Protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bryan, J.K.** (1990). In *The Biochemistry of Plants*, vol. **16** (Mifflin, B.J.; Lea P.J., eds.). New York: Academic Press, pp. 161-196.

- Bray, A.E.** (1993). Molecular Responses to Water Deficit. *Plant Physiol* **103**, 1035-1040.
- Chandler, P.M. e Robertson, M.** (1994). Gene Expression Regulation by Abscisc Acid and Its Relation to Stress Tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 113-141.
- Creelman, R.A. e Mullet, J.E.** (1995). Jasmonic Acid Distribution and Action in Plants: Regulation During Development and Response to Biotic e Abiotic Stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4114-4119.
- Creelman, R.A. e Mullet, J. E.** (1997). Biosynthesis and Action of Jasmonates in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 355-381.
- Dalby, A. e Tsai, Y.** (1975). Comparisons of Lsine an Zein and Nonzein Protein Contents in Immature and Mature Maize Endosperm Mutants. *Crop Sci.* **15**, 513-515
- Deleu, C.; Coustaut, M.F.; Niogret, F. and Larher, F.** (1999). Three New Osmotic Stress-regulated cDNAs Identified by Differential Display Polymerase Chain Reaction in Rapeseed Leaf Discs. *Plant Cell and Environment* **22**, 979-988.
- Dixon, A. R e Steele, C.L.** (1999). Flavonoids and Isoflavonoids- A Gold Mine for Metabolic Engineering. *Trends in Plant Science* **44** (10), 394-400.
- Dixon, A.R.** (2001). Natural Products and Plant Disease Resistance. *Nature* **4117**, 843-847.
- Falkenstein, E.; Groth, B.; Mithöfer, A. e Weiler, E.W.** (1991). Methyl Jasmonate and Linolenic Acid Are Potent Inducers of Tendril Coiling. *Planta* **185**, 316-322.
- Foster, A.R.; Scislowiski, P.W.D.; Harris, C.L e Fuller, M.F.** (1993). Metabolic Response of Liver Lysine- $\alpha$ Ketoglutarate Reductase Acitivity in Rats Fed Lysine Limiting or Lysines Excessive diets. *Nutr. Res.* **13**, 1433-1443.

- Fukutoku, Y. e Yamada, Y. (1981).** Sources of Proline Nitrogen in Water-Stressed soybean (*Glycine max* L.) I. Protein Metabolism and Proline Accumulation. *Plant Cell Physiol.* **22** (8), 1397-1404.
- Galili, G. (1995).** Regulation of Lysine and Threonine Synthesis. *The Plant Cell.* **7**, 899-906.
- Galili, G.; Tang, G.; Zhu, X. e Gakiere, B. (2001).** Lysine Catabolism: A Stress and Development Super-regulated Metabolic Pathway. *Curr. Opin. in Plant Biol.* **4**, 261-266.
- Gaziola, S.A., Teixeira, C.M.G., Lugli, J., Sodek, L., Azevedo, R.A. (1997).** The Enzymology of Lysine Catabolism in Rice Seeds – Isolation, Characterization, and Regulatory Properties of Lysine 2-oxoglutarate Reductase/Saccharopine Dehydrogenase Bifunctional Polypeptide. *Eur. J. Biochem.* **274**, 364-371.
- Giraudat, J.; Parcy, F.; Bertauche, N.; Gosti, F.; Leung, J.; Morris, P-C.; Bouvier-Durand, M.; e Vartanian, N. (1994).** Current Advances in Abscisic Acid Action and Signalling. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1557-1577.
- Gonçalves-Butruille, M.; Szajner, P.; Torigoi, E.; Leite, A. e Arruda, P. (1996).** Purification and Characterization of the Bifunctional Enzyme Lysine-Ketoglutarate Reductase-Saccharopine Dehydrogenase from maize. *Plant Physiol.* **110**, 765-771
- Guiltinan, M.J.; Marcotte, W.R. e Quatrano, R.S. (1990).** A Plant Leucine Zipper Protein That Recognizes an Abscisic Acid Response Element. *Science* **250**, 267-271.
- Gundlach, H.; Müller, M.J.; Kutchan, T.M. e Zenk, M.H. (1992).** Jasmonic Acid Is a Signal Transducer in Elicitor-Induced Plant Cell Cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2389-2393.

- Gupta, S.; Chattopadhyay, M.K.; Chatterjee, P.; Ghosh, B. e SenGupta, D.N.** (1998). Expression of Abscisic Acid-Responsive Element-Binding Protein in Salt-Tolerance Indica Rice (*Oryza sativa*. L.cv. Pokkali). *Plant Mol. Biol.* **37**, 629-637.
- Hamberg, M. e Gardner, H.W.** (1992). Oxylin Pathwau to Jasmonates: Biochemistry and Biological Significance. *Biochim. Biophys. Acta* . **1165**, 1-18.
- Hanson, A.D.; Neslen, C.E.; Pedersen, A.R. e Everson, E.H.** (1979). Capacity for Proline Accumultion During Water Stress in Barley and Its Implications for Breeding for Drought Resistance. *Crop Sci.* **19**, 489-493.
- Hare, P.D. e Cress, W.A.** (1997). Metabolic Implication of Stress-Induced Proline Accumulation in Plants. *Plant Growth Reg.* **21**, 79-102.
- Herde, O.; Atzorn, R.; Fisahn, J.; Waterneck, C.; Willmitzer, L. e Peña-Cortés, H.** (1996). Localized Wounding by Heat Initiates the Accumulation of Proteinase Inhibitor II in Abscisic Acid-Deficient Plants by Triggering Jamonic Acid Biosynthesis. *Plant Physiol.* **112**, 853-860.
- Karchi, H.; Shaul, O. e Galili, G.** (1994). Lysine Synthesis and Catabolism Are coordinately Regulated During Tobacco Seed Development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2577-2581.
- Karchi, H.; Miron, D.; Bem-Yaacov, S. e Galili, G.** (1995). The Lysine-dependent Stimulation of Catabolism in Tobacco Seeds Requires Calcium and Protein Phosphorylation. *Plant Cell* **7**, 1963-1970.
- Kemper, E. L.; Neto, G. C.; Papes, F.; Moraes, K. C. M.; Leite, A. e Arruda, P.** (1999). The Role of Opaque2 in the Control of Lysine-degrading Activities in Developing Maize Endosperm. *Plant Cell* **11**, 1981-1994.

- Kim, S-R.; Choi, J-L.; Costa, M.A. e An, G. (1992).** Identification of G-Box Sequence as an Essential Element for Methyl Jasmonate Response of Potato Proteinase Inhibitor II Promoter. *Plant Physiol.* **99**, 627-631.
- Kircher, S.; Ledger, S.; Hayahi, H.; Weisshaar, B.; Schäfer, E. e Frohnmeyer, H. (1998).** CPRF4a, a Novel Plant bZIP Protein of the CPRF Family: Comparative Analyses of Light-dependent Expression, Post-transcriptional Regulation, Nuclear Import and Heterodimerisation. *Mol. Gen. Genet.* **257**, 595-605.
- Klessig, D.F.; Durner, J.; Noad, R.; Navarre, D.A.; Wendehenne, D.; Kumar, D.; Zhou, J.M.; Shah, J.; Zhang, S. e Kachroo, P. (2000).** Nitric Oxide and Salicylic Acid Signaling in Plant Defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8849-8855.
- Klotz, K.L. e Lagrimini, L.M. (1996).** Phytohormone Control of the Tobacco Anionic Peroxidase Promoter. *Plant Mol. Biol.* **31 (3)**, 565-573.
- Kusano, T.; Berberich, T.; Harada, M.; Suzuki, N. e Sugawara, K. (1995).** A Maize DNA-Binding Factor with a bZIP Motif Is Induced by Low Temperature. *Mol. Gen. Genet.* **248**, 507-517.
- Lam, H.M.; Chiu, J.; Hsieh, M.H.; Meisel, L.; Oliveira, I.C.; Shin, M. e Coruzzi, G. (1998).** Glutamic Acid, Receptor Genes in Plants. *Nature* **396**, 125-126.
- Larher, F.; Lepoint, L.; Petrivalsky, M. e Chappart, M. (1993).** Effectors for the Osmoinduced Proline Response in Higher Plants. *Plant Physiol. Biochem.* **31**, 911-922.
- Marcotte, W.R.; Russel, S.H. e Quatrano, R.S. (1989).** Abscisic Acid-responsive Sequence From the *Em* Gene of Wheat. *Plant Cell* **1**, 969-976.

- Masson H.S. e Mullet, J.E.** (1990). Expression of Two Soybean Vegetative Storage Protein Genes During Development and in Response to Water Deficit, Wounding, and Jmonic Acid. *The Plant Cell* **2**, 569-579.
- Masson, H.S.; DeWald, D.B. e Mullet, J.E.** (1993). Identification of a Methyl Jamonate-responsive Domain in the Soybean vspB Promoter. *The Plant Cell* **5**, 241-251.
- Merkouropoulos, G.; Barnett, D.C. e Shirsat, A. H.** (1999). The Arabidopsis Extensin Gene is Developmentally Regulated, Is Induced by Wounding, Methyl Jasmonate, Abscisic and Salicylic acid, and Codes for a Protein with Unusual Motif. *Planta* **208**, 212-219.
- Mertz, S. L.; Bates, L.S.e Nelson, O.E.** (1964). Mutant Gene That Changes Protein Composition and Increases Lysine Content of Maize Endosperm. *Science* **145**, 279-280.
- Miron, D.; Ben-Yaacov, S.; Reches, C.; Schupper, A. e Galili, G.** (2000). Purification and Characterization of Bifunctional Enzyme Lysine-Ketoglutarate Reductase/Saccharopine Dehydrogenase from Developing Soybean Seeds. *Plant Physiol.* **123**, 655-663.
- Moulin, M.; Deleu, C. e Larher, F.** (2000). L-Lysine Catabolism is Osmo-regulated at the Level of Lysine-Ketoglutarate Reductase and Saccharopine Dehydrogenase in Rapeseed Leaf Discs. *Plant Physiol. Biochem.* **38**, 577-585.
- Mundy, J.; Yamaguchi-Shinozaki, K. e Chua, N-H.** (1990). Nuclear Proteins Bind Conserved Elements in the Abscisic Acid-responsive Promoter of a Rice *rab* Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1406-1410.
- Nuccio, M.L.; Rhodes, K.; McNeil, S.D. e Hanson, A.D.** (1999). Metabolic Engineering of Plants for Osmotic Stress Resistance. *Curr. Opin. in Plant Biol.* **2**, 128-134.
- Paiva, N.L.** (2000). An Introduction to the Biosynthesis of Chemicals Used in Plant-Microbe Communication. *J. Plant Growth Regul.* **19**, 131-143.

- Payne, P.I.** (1983). Breeding For Protein Quantity and Protein Quality in Seed Crops. In ,Seed Proteins. London, Academic Press, pp 223-253.
- Ptashne, M.** (1998). How Eukariotic Transcriptional Activators Work. *Nature* **335**, 683-689.
- Reinbothe, S.; Mollenhauer, B. e Reinbothe, C.** (1994). JIPs and RIBs: The Regulation of Plant Gene Expression by Jasmonates in Response to Environmental Cues and Pathogens. *Plant Cell* **6**, 1197-1209.
- Rishi, V.; Anjum, F.; Ahmad, F. e Pfeil, W.** (1998). Role of Non-Campatible Osmolytes in The Stabilization of Proteins During Heat Stress. *Biochem. J.* **329**, 137-143.
- Rhodes, D e Samaras, Y.** (1994). Genetic Control of Osmoregulation in Plants. In *Celular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*. Edited by Strange K. Boca Raton: CRC Press. 81-109.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. e Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Schmidt, R. J.; Ketudat, M.; Aukerman, M. J. and Hoschek, G.** (1992). Opaque-2 Is a Transcription Activator that Recognizes a Specific Site in 2-kD Zein Genes. *Plant Cell* **4**, 689-700.
- Sembdner, G. e Parthier, B.** (1993). The Biochemisty and the Physiological and Molecular Actions of Jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 569-589.
- Shewry, P.R. e Casey, R.**(1999). In *Seed Proteins* (Casey, R and Shewry, P.R., eds), pp. 1-10, Kluwer Academic Publishers.

- Sodek, L. e Wilson, C.M.** (1970). Incorporation of Leucine-C<sup>14</sup> and Lysine-C<sup>14</sup> into Protein in the Developing Endosperm of Normal and *Opaque-2* Corn. *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 858-864.
- Staswick, P.E.** (1992). Jasmonate, Genes, and Fragrant Signals. *Plant Physiol.* **99**, 804-807.
- Tang, G., Miron, D., Zhu-Shimoni, J.X. e Galili, G.** (1997). Regulation of Lysine Catabolism Through Lysine-Ketoglutaric Acid Reductase and Saccharopine Dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**, 1305-1316.
- Verhage, M.; Maia, A.S.; Plomp, J.J.; Brussaard, A.B.; Heeroma, J.H.; Vermeer, H.; Toonen, R.F.; Hammer, R.E.; Van den Berg, T.K.; Missler, M.; Geuze, H.J. e Sudhof, T.C.** (2000). Synaptic Assembly of the Brain in the Absence of Neurotransmitter Secretion. *Science* **287**, 864-869.
- Vivekananda, J.; Drew, M.C. e Thomas, T.L.** (1992). Hormonal and Environmental Regulation of the Carrot *lea*-class Gene *Dc3*. *Plant Physiol.* **100**, 576-581.
- Wasternack, C.; Ortel, B.; Miersch, O.; Kramell, R.; Beale, M.; Greulich, F.; Feussner, L.; Hause, B.; Krumm, T.; Boland, W. e Parthier, B.** (1998). Diversity in Octadecanoid-induced Gene Expression of Tomato. *J. Plant. Physiol.* **152**, 345-352.
- Williams, M. E.; Foster, R. e Shua, N. H.** (1992). Sequences Flanking the Hexameric G-Box Core CACGTG Affect the Specificity of Protein-binding. *The Plant Cell* **4**, 485-496.
- Yoshida, Y.; Kiyosue, T.; Nakashima, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. e Shinozaki, K.** (1997). Regulation of Levels of Proline as an Osmolyte in Plants Under Water Stress. *Plant Cell Physiol.* **38** (10), 1095-1102.