

MODULAÇÃO DA PIROFOSFATASE VACUOLAR (H^+ -PPase) POR
ÁCIDO ABSCÍSIKO EM PLANTAS SUBMETIDAS AO DÉFICIT
HÍDRICO

LUÍS ALFREDO DOS SANTOS PRADO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO-UENF

CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL DE 2013

MODULAÇÃO DA PIROFOSFATASE VACUOLAR (H^+ -PPase) POR
ÁCIDO ABSCÍSIKO EM PLANTAS SUBMETIDAS AO DÉFICIT
HÍDRICO

LUÍS ALFREDO DOS SANTOS PRADO

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em biociências e biotecnologia”

Orientador: Profº Arnaldo Rocha Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ABRIL DE 2013

MODULAÇÃO DA PIROFOSFATASE VACUOLAR (H^+ -PPase) POR
ÁCIDO ABSCÍSIKO EM PLANTAS SUBMETIDAS AO DÉFICIT
HÍDRICO

LUÍS ALFREDO DOS SANTOS PRADO

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em biociências e biotecnologia”

Aprovada em

Comissão Examinadora

Lívia M. Palma (Dra. Biociências e Biotecnologia – UENF)

Claudio Andres Retamal Martinez (Dr. Biociências e Biotecnologia – UENF)

Alessandro Ramos Coutinho (Dr. Biociências e Biotecnologia – UVV)

Prof. Arnaldo Rocha Façanha –(Dr. Química Biológica - LBCT – CBB – UENF)
(Orientador)

Sumário

Resumo	8
Abstract.....	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. O microtomateiro mutante (Micro-Tom).....	12
2.2 Estresse hídrico e osmótico em plantas	13
2.2.1 Respostas Moleculares ao Estresse Hídrico	13
2.3 O Ácido Abscísico	14
2.4 O transporte de solutos através das membranas de células vegetais	15
2.4.1 A H ⁺ -PPase	17
3. HIPÓTESE	18
4. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo Geral	19
4.2 Objetivos Específicos	19
5. MATERIAIS MÉTODOS	20
5.1 Material vegetal.....	20
5.2 Indução do déficit hídrico nas plantas	20
5.3 Preparação da Fração Microssomal.....	20
5.4 Determinação de proteínas.....	21
5.5 Determinação da atividade hidrolítica das Bombas de H ⁺	21
5.6 Monitoramento do gradiente de prótons	22
5.7 Eletroforese em gel	22
5.8 WesternBlotting.....	23
5.9 Expressão relativa de RNAm.....	23
5.9.1 Extração de RNA total	23
5.9.2 Transcriptase Reversa (RT) seguida da Reação em Cadeia da Polimerase	24

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
6.1 Plantas	26
6.2 Atividade hidrolítica das bombas de prótons	28
6.3 Gradiente de prótons	32
6.4 Expressão de proteínas.....	34
6.5 Expressão relativa de RNAm	40
7. CONCLUSÕES	42
8. REFERÊNCIAS	43

Agradecimentos

À Deus,

Ao meu irmão Assis e minha tia Marta por todo o apoio e amor durante toda a minha vida;

Ao professor Arnoldo pelos ensinamentos, pela orientação e por me conceder a oportunidade realizar este trabalho nas melhores condições possíveis;

A minha namorada Janaína Hottz pelo amor, convívio e inestimável contribuição na realização deste trabalho. Te amo.

A todos os integrantes do grupo ARF: Amanda, Antonio, Brunna, Gil, Inga, Julianna, Josimara, Raul e Camila pela convivência;

Ao Prof. Dr. Lázaro E. P. Peres (Esalq – USP) pelas sementes utilizadas neste trabalho;

Ao professor Carlos Logullo e seus alunos pelas discussões, sugestões e críticas;

Ao professor Claudio Retamal por abrir cordialmente seu laboratório para a realização de experimentos;

A Beatriz, Marlene e profa. Kátia da CPGBB pela prestatividade;

À Faperj pela concessão da bolsa;

Aos meus amigos Antonio Melo (Nunes), Paulo Victor (PV), Pedro Higino (Leitão) e José Carlos (Juneba) pela amizade e momentos de descontração, principalmente jogando futebol e videogame.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Resumo

A seca é um dos principais fatores limitantes ao crescimento e desenvolvimento vegetal em todo o mundo. Durante a seca, o ácido abscísico (ABA) se destaca dentre outros hormônios, na regulação do potencial hídrico e do turgor celular. O turgor celular é parcialmente controlado pelas bombas de prótons vacuolares, que geram gradiente de íons H^+ através do tonoplasto e facilitam o transporte secundário de outros íons e água para o lúmen do vacúolo. Dentre as principais bombas de prótons presentes em plantas superiores estão as ATPases do tipo P (P-ATPase) e do tipo V (V-ATPase). A pirofosfatase vacuolar (H^+ -PPase) é uma bomba de prótons que utiliza pirofosfato como substrato atuando diretamente na manutenção da homeostase iônica e energética da célula vegetal. A cultivar em miniatura *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom (MT) foi proposta como um modelo genético com potencial para superar as desvantagens do cultivo de tomateiro comercial para fins de pesquisa, além de algumas vantagens em relação ao modelo mais usual *Arabidopsis*. A fim de elucidar os mecanismos pelos quais ABA influencia na manutenção do gradiente de íons H^+ através das membranas vegetais, foi analisado no presente trabalho o funcionamento da H^+ -PPase em MT do genótipo selvagem (WT) e do genótipo mutante defectivo para a produção de ABA (Not) expostos ao déficit hídrico e submetidos a reirrigação após 48 horas. Durante o déficit, as atividades ATPásicas foram reduzidas em ambos os genótipos, enquanto a atividade da H^+ -PPase foi aumentada em ambos os genótipos, mostrando um maior acoplamento hidrólise de PPI/bombeamento de H^+ no mutante Not. O déficit também causou redução na expressão das bombas em ambos os genótipos. Após a reirrigação, as bombas apresentaram uma recuperação nas atividades, com exceção da V-ATPase. Os níveis de transcritos para a H^+ -PPase também foram aumentados em resposta ao déficit, sugerindo a participação do ABA na manutenção do turgor celular através da regulação no nível bioquímico e molecular desta enzima.

Palavras-chave: ABA, Déficit hídrico, Bombas de prótons

Abstract

Drought is one of the main limiting factors for plant growth and development worldwide. During the drought, abscisic acid (ABA) stands out among other hormones in the regulation of water potential and turgor of the cell. This turgor is partially controlled by vacuolar proton pumps that generates an H^+ ions gradient through the tonoplast making possible secondary transport of ions and water to the vacuole lumen. Among the main proton pump present in higher plants are the P-type ATPase (P-ATPase) and the V-type ATPase (V-ATPase). The vacuolar pyrophosphatase (H^+ -PPase) is a proton pump that uses pyrophosphate as substrate acting directly at ion homeostasis and plant cell energetic. The miniature cultivar *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom (MT) was proposed as a genetic model with the potential to overcome the disadvantages of commercial tomato cultivation for research purposes, presenting advantages over Arabidopsis. In order to elucidate the mechanisms by which ABA influences in maintaining the gradient of ions H^+ across plant membranes, was evaluated at the present work the H^+ -PPase in MT plants of the Wild-Type genotype (WT) and the mutant ABA-defective genotype (Not) subjected to drought and rehydration after 48 hours. During the drought, the ATPase activities were reduced in both genotypes while the H^+ -PPase activity was enhanced showing a higher coupling hydrolysis/ H^+ pumping at the Not genotype. Drought also caused reduction on this pumps expression in both genotypes. After rehydration, the pumps shown a recuperation in the activities, excepting V-ATPase. The H^+ -PPase transcript levels also was enhanced during drought, suggesting the ABA participation in maintaining cell turgor through regulation of this enzyme at biochemical and molecular levels.

Key Words: ABA, Drought Stress. Proton pumps

1. INTRODUÇÃO

A seca é um grande entrave à produtividade vegetal, pois além de afetar as relações hídricas alterando o metabolismo da planta, tem ocorrência mundial. Os vegetais podem ser expostos ao estresse hídrico desenvolvido a curto ou longo prazo, como consequência de declínios sazonais na disponibilidade hídrica dos solos. No decorrer do dia, o incremento na demanda evaporativa da atmosfera afeta o ganho de carbono até nas plantas irrigadas, portanto, o tempo, a intensidade e a duração da deficiência hídrica são essenciais para determinar os efeitos desse estresse. Abertura estomática, assimilação de CO₂, síntese de proteínas e acúmulo de solutos, são alguns dos diversos processos bioquímico/fisiológicos alterados em resposta ao abaixamento do potencial hídrico foliar. A profundidade em que cada processo é afetado depende da intensidade e duração do estresse, bem como da capacidade genética das espécies em produzir nesses ambientes (Chaves, 1991).

Plantas expostas a diversos estresse abióticos como seca, salinidade, frio e exposição a radiação UV-B produzem estímulos regulados por ácido abscísico (ABA). O ABA em seus níveis basais regula vários processos fisiológicos do desenvolvimento vegetal como abertura/fechamento estomático, desenvolvimento da semente, morfogênese do embrião, dormência e síntese de proteínas e lipídeos de reserva. (Finkelstein et al. 2002; Sreenivasulu et al. 2006). Porém, sua participação na tolerância a estresses vem assumindo papel central, pois é considerado um mensageiro essencial envolvido nas respostas adaptativas das plantas a estresses bióticos e abióticos. (Umezawa et al. 2006).

Muitas enzimas importantes fazem parte do metabolismo energético, todavia, neste estudo, focamos principalmente as principais bombas de H⁺ das células vegetais. As H⁺-ATPases, do tipo P e V, são os principais sistemas consumidores da energia metabólica celular. Por outro lado, a célula vegetal também dispõe de H⁺-pirofosfatases associadas às endomembranas (H⁺-PPases), as quais geram gradientes eletroquímicos sem consumir ATP, acoplando a hidrólise de outro composto fosfatado, o pirofosfato inorgânico (PPi), à geração de uma força próton-motora que energiza os transportadores secundários, responsáveis pela nutrição e manutenção da homeostase celular (Serrano, 1989; Sze et al. 1999).

Considerando que alguns pontos relativos às bases energéticas desse processo permanecem obscuros, o objetivo deste trabalho consiste em averiguar a

relação entre a atividade hidrolítica e expressão gênica da H⁺-PPase da membrana vacuolar visando investigar as bases bioquímicas e moleculares do processo de sinalização iônica inerentes ao déficit hídrico em tecidos foliares de microtomateiros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O microtomateiro mutante (Micro-Tom)

O tomateiro é uma espécie cultivada de grande importância econômica, responsável por gerar grande demanda por conhecimentos básicos em estudos envolvendo a sua fisiologia. O tomateiro é um excelente modelo para estudar processos biológicos devido a sua diversidade de metabólitos secundários (Tanksley, 1993) e tecidos que facilitam análise bioquímica, além do próprio padrão morfogenético diferente de *Arabidopsis*, que coloca o tomateiro como um modelo adicional de dicotiledônea em estudos comparativos (Pratt et al. 1997). O tomateiro possui um genoma relativamente pequeno ($7,1 \times 10^8$ pb), mapas cromossômicos bem estruturados com marcadores clássicos e moleculares (Rick & Yoder, 1988; Tanksley et al. 1993).

As principais limitações para utilização intensiva de tomateiro como modelo em abordagens genéticas e fisiológicas são seu tamanho e duração do ciclo de vida, os quais, embora sejam relativamente pequenos, estão em desvantagem quando comparados a *Arabidopsis*, a qual é o modelo mais usado em pesquisas com plantas. Desse modo, a cultivar em miniatura de tomateiro, proposta por Meissner et al. (1997) como modelo genético, apresenta uma série de vantagens sobre a *Arabidopsis* pois produz frutos e semente viáveis em vasos de apenas 50-100 ml de substrato, completando seu ciclo de vida em 70-90 dias e possibilita interações micorrízicas. Com essas características, a chamada cultivar Micro-Tom (MT) pode crescer em laboratório nas mesmas condições mínimas que *Arabidopsis*.

Mutantes de tomateiro podem ser usados como eficiente ferramenta em estudos genéticos. Entre as várias mutações já descritas em tomateiro, aparecem mutantes que apresentam alterações no metabolismo ou na sensibilidade a hormônios do tipo auxina (Kelly & Bradford, 1986; Hicks et al., 1989), ácido abscísico (Taylor et al. 2000; Burbidge, 1999) giberelinas (Koornneef et al. 1990; Bensen & Zeevaart, 1990), etileno (Fujino et al. 1988; Wilkinson et al. 1995) e brassinoesteróides (Bishop et al. 1999; Koka et al. 2000).

2.2 Estresse hídrico e osmótico em plantas

Com frequência, os vegetais são expostos a diversas condições ambientais que afetam seu crescimento e desenvolvimento. A deficiência hídrica é um dos grandes estresses abióticos que podem afetar todos os níveis de organização vegetal, podendo representar uma séria ameaça à produtividade das plantas em todo o mundo. Para Chaves (1991) a extensão dos efeitos da deficiência hídrica nas espécies vegetais depende da sua intensidade e da duração da capacidade genética das plantas em responder às mudanças do ambiente.

Em resposta a esse estresse, as plantas recorrem a várias estratégias para sua sobrevivência, a maioria é precedida por funções biológicas relacionadas a tolerância do estresse ambiental.

2.2.1 Respostas Moleculares ao Estresse Hídrico

As plantas contêm cerca de 10^{10} a 10^{11} pares de bases de nucleotídeos nas suas moléculas de DNA, os quais podem representar de 50.000 a 100.000 genes (Lehninger et al., 1993). Entretanto, assim como em outros organismos superiores, somente uma pequena porção desses genes é expressa, num dado momento, pelas células da planta. É a escolha de quais genes serão expressos que determina todos os processos vitais. A comparação da expressão gênica em diferentes células e organismos poderia fornecer a informação básica necessária para a análise dos processos biológicos que controlam a maneira como os organismos respondem a diferentes situações (Liang e Pardee, 1992).

O déficit hídrico em plantas inicia um complexo de respostas, começando com a percepção do estresse, o qual desencadeia uma cascata de eventos moleculares que é finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento (Bray, 1993).

Os modelos de percepção do estresse, sendo estabelecidos para vegetais superiores, mostram que a mudança no volume de células individuais de uma raiz ou outro órgão submetido à desidratação altera o potencial de pressão e o potencial osmótico dessas células. Isso provoca alterações na membrana celular e em vários de seus componentes, assim como na concentração celular de metabólitos. Essas modificações ativam complexos enzimáticos que iniciam uma cascata de eventos

moleculares que levam a indução de várias categorias de genes (Hare et al. 1996; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1996, 1997, 1999). Alguns mecanismos de percepção vêm sendo estudados hoje em plantas e entre eles estão as sequencias promotoras responsivas ao ácido abscísico (ABA) (Abe et al. 1997); etc.

Genes induzidos pelo déficit hídrico promovem: tolerância da célula à desidratação; funções de proteção no citoplasma; alterações no potencial osmótico celular para aumentar a absorção de água; controle da acumulação de íons; regulação adicional de expressão gênica; metabolização de compostos degradados pelo estresse, etc (Bray, 1993; Bray, 1997; Nepomuceno et al. 2000).

Acredita-se que muitos dos produtos de genes induzidos pelo déficit hídrico possam proteger as estruturas celulares dos efeitos da perda de água (Boyer, 1996; Alvin et al., 2001). Entretanto, a expressão dos genes durante o estresse não garante que um produto gênico promova a habilidade da planta em sobreviver ao estresse (Bray, 1993). A expressão de alguns genes pode resultar de ferimento ou dano que tenha ocorrido durante o estresse. No entanto, alguns genes são necessários para a tolerância ao estresse e a acumulação dos produtos da expressão desses genes pode tornar-se uma resposta adaptativa (Bray, 1993; Bray, 1997), assim como a desativação da expressão de um gene pode também estar ligada ao aumento da tolerância ao estresse (Nepomuceno et al. 2000).

2.3 O Ácido Abscísico

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio essencial que possui também o papel como um mensageiro endógeno em resposta ao estresse biótico e abiótico de plantas, regula o crescimento e abertura estomática das plantas em resposta a estresses ambientais (Davies & Zhang 1991), a maturação e dormência de sementes (Rock & Quatrano 1995), e desempenha um papel fundamental na translocação de substâncias orgânicas e no metabolismo de plantas (Brenner, 1987; Wayne & John, 1996). O ABA tem suas funções bem conhecidas com atividades ligadas ao crescimento vegetal, dormência e germinação, podendo ser um inibidor ou promotor de crescimento, na presença ou ausência de estresse, como seca e estresse osmótico (Stasolla & Yeung, 2003).

Tem sido sugerido que o ABA induz a atividade de canais aniônicos em proporção mais elevada que a queda da H⁺-ATPase, sugerindo que, o efeito inibidor do ABA na bomba de prótons, tem envolvimento com a despolarização e a ativação

dos canais de ânions, também proporcionadas por esse fitormônio (Brault et al. 2004). Conseqüentemente há um efeito simultâneo entre os dois mecanismos, o qual é responsável pela despolarização da membrana como resposta ao ABA (Brault et al. 2004). O fluxo iônico exerce papel chave na captura de energia, sendo responsável pela mediação da interconversão entre as formas biológicas de energia, ou seja, osmótica, química e elétrica, bem como, dar suporte a diversos processos fisiológicos, inclusive o transporte ativo (Sze et al., 1999).

Os genes induzidos pela deficiência hídrica estudados até hoje., na sua maioria, são também induzidos pelo ABA (Bray, 1993; Wu et al., 1997). Com base nessa informação, o ABA é o melhor candidato a ser visto como um segundo mensageiro na mediação entre o sinal ambiental indutivo e a resposta molecular e fisiológica (Bray, 1993). Além das evidências de que o ABA afeta as respostas à seca, à salinidade e ao estresse de frio, também foi demonstrado que está envolvido na embriogênese, na indução de proteínas de reserva da semente, na dormência, na abscisão, na germinação das sementes, no crescimento, no controle da abertura estomática e no geotropismo (Arteca, 1996).

2.4 O transporte de solutos através das membranas de células vegetais

O movimento de íons através das membranas biológicas (membrana plasmática e endomembranas de diferentes organelas celulares) é um processo altamente seletivo e fundamental na manutenção da energia celular (Harold, 1986). Este processo é desempenhado por complexos protéicos localizados nas membranas, que constituem os sistemas de transporte transmembranares, distribuídos em proteínas canais, proteínas carreadoras (ou transportadoras) ou, ainda, como bombas eletrogênicas. Em resposta à ação destas moléculas, alguns compostos são acumulados na célula a concentrações bem mais elevadas que as encontradas no ambiente externo, enquanto outros são totalmente excluídos (Taiz e Zeiger, 1998).

Os sistemas de transporte, presentes nas membranas biológicas, podem ser classificados em sistemas primários e secundários. Os sistemas primários são constituídos pelas bombas eletrogênicas. Estes são responsáveis pelo estabelecimento de um gradiente eletroquímico gerado ao transportar íons contra um gradiente de concentração, utilizando-se para isso compostos ricos em energia.

Já os sistemas secundários, constituídos pelas proteínas canais e as carreadoras ou transportadoras, são capazes de transportar substratos (ATP ou PPI) através da membrana, sem envolver quebra de ligações covalentes. Este processo depende do desequilíbrio de cargas, gerado na membrana, pelos sistemas primários (Logan et al., 1997).

As proteínas canais, enquanto no estado “aberto”, comportam-se como poros seletivos através dos quais é permitida a passagem de substratos específicos sem que ocorram alterações morfológicas na proteína. Várias classes de proteínas canais têm sido descritas nos sistemas vegetais, incluindo as específicas para K^+ , Ca^{++} e ânions. Nestas, o gradiente elétrico determinará a direção e extensão do fluxo passivo de íons (Sze et al., 1999).

Com relação às proteínas transportadoras, estas sofrem um ciclo de alterações morfológicas, que acompanham o percurso da molécula ou íon através das mesmas (Logan et al., 1997).

O transporte mediado pelas proteínas canais e carreadores “uniporters”, ocorre a favor do gradiente eletroquímico. Por outro lado, o transporte mediado pelos co-transportadores - “simporters” e “antiporters” - conseguem mover seus substratos tanto a favor como contra um gradiente de potencial elétrico, acoplando esse transporte ao de outro substrato que se movimenta a favor do gradiente, respectivamente. Esses sistemas transportam os principais nutrientes essenciais ao funcionamento da célula vegetal e são dependentes da energia provida pelo gradiente eletroquímico de H^+ gerado por bombas de prótons presentes nas membranas das células vegetais (Façanha e de Meis, 1995).

As adenosinas 5`- trifosfatases translocadoras de íons H^+ (H^+ -ATPases) são enzimas transportadoras responsáveis pelo fluxo primário de prótons através das membranas celulares. Essas enzimas pertencentes à classe das bombas de prótons são responsáveis pela interconversão de energia química, elétrica e/ou luminosa nas células de todos os organismos vivos. Nas células vegetais, as H^+ -ATPases acoplam a hidrólise de ATP ao transporte de prótons através das membranas, gerando uma diferença de potencial eletroquímico, requerido para o transporte secundário, o qual é completamente dependente da força motriz de prótons (FPM). A quantificação da FPM pode ser usada para estimar a energia livre contida no potencial de prótons. Este potencial é criado, através da membrana, por um bombeamento de prótons executado pelas H^+ -ATPases e H^+ -PPases (Sanders e Bethke, 2000).

2.4.1 A H⁺-PPase

A pirofosfatase (H⁺-PPase) é uma bomba de prótons eletrogênica que acidifica o lúmen do vacúolo nas células vegetais. Possui uma cadeia polipeptídica única com massa molecular em torno de 80 kDa, e utiliza um substrato de baixo custo energético denominado pirofosfato inorgânico (PPi) que é produzido em várias etapas dos processos de biosíntese de proteínas, carboidratos, lipídeos e nucleotídeos (Rea & Poole, 1993).

As H⁺-PPases coexistem com outras bombas de prótons (V-ATPases) na membrana vacuolar das células de plantas, sendo funcionais na energização dos sistemas de transporte secundários do tonoplasto. Estas enzimas também atuam no controle da homeostase citoplasmática, em sincronismo com as V-ATPases de tonoplasto e com as H⁺-ATPases de plasmalema (Taiz & Zeiger, 2009; Rea et al., 1992; Sze et al., 1999, Zandonadi et al., 2007).

As PPases podem ser divididas em três classes: PPase solúvel, PPase associada a membrana e H⁺-PPase associada a membrana. Somente a H⁺-PPase possui a habilidade para transportar prótons através de membranas biológicas. As plantas possuem dois tipos filogeneticamente distintos de H⁺-PPases: o tipo I, que depende do K⁺ citosólico para a sua atividade e é sensível moderadamente a Ca²⁺, e o tipo II, que é insensível a K⁺ e extremamente sensível a Ca²⁺ (Gaxiola, 2007).

Em diversas condições fisiológicas e de estresse, o pirofosfato pode assumir o papel do ATP, atuando como doador de energia metabólica da célula (Stitt, 1989). Em condições de estresse as concentrações de PPi permanecem estáveis na célula, enquanto o nível de ATP decresce (Weiner et al, 1987), com isso, a PPase pode assumir grande importância sob condições de estresses mantendo o gradiente de prótons através da membrana vacuolar para sustentar os transportadores secundários.

3. HIPÓTESE

O ácido abscísico influencia a modulação pré- e pós-transcricional da H⁺-PPase vacuolar constituindo este um processo fundamental na sinalização iônica relacionada as respostas adaptativas da célula vegetal ao estresse hídrico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Elucidar os mecanismos pelos quais o fitormônio ABA influencia a modulação da H⁺-PPase vacuolar no nível bioquímico e molecular em resposta ao estresse hídrico caracterizando e relacionando atividade enzimática, concentração de transcritos de RNA e sua colocalização no tonoplasto, visando identificar aspectos energéticos e da sinalização por ABA.

4.2 Objetivos Específicos

- Verificar as relações existentes entre a síntese de ABA em microtomateiros mutantes (ABA+ e ABA-) e a regulação diferencial da H⁺-PPase em resposta ao estresse hídrico.
- Verificar os níveis de expressão gênica da H⁺-PPase em tecidos de microtomateiros mutantes (ABA+ e ABA-) submetidas ao estresse hídrico;
- Avaliar as mudanças no perfil proteico e a expressão diferencial da H⁺-PPase em plantas submetidas ao déficit hídrico relacionando os níveis de atividade da enzima com os níveis de expressão dos genes, a fim de caracterizar as interações pelas quais o fitormônio ABA modula esta enzima nas respostas da planta ao estresse .

5. MATERIAIS MÉTODOS

5.1 Material vegetal

No presente trabalho foram utilizados microtomateiros (MT) do grupo controle *Wild Type* (WT) e o mutante hormonal *Notabilis* (Not) o qual é defectivo para o gene que codifica enzima chave na quebra de carotenóides precursores do ABA, a NCED (9-cis-epoxycarotenoide dioxigenase). Esta mutação é recessiva e produzida por tratamentos com raios X.

5.2 Indução do déficit hídrico nas plantas

Plantas com 45 dias de idade foram submetidas ao estresse hídrico através de suspensão da irrigação por 10 dias. Foram realizados experimentos com 6 tratamentos sendo controle sob condições normais de irrigação (WT); submetido ao déficit hídrico por suspensão da irrigação por 10 dias (WT 10d); 48 horas após a reirrigação (WT R); mutante sob condições normais de irrigação (Not); mutante submetido ao déficit hídrico por suspensão da irrigação por 10 dias (Not 10d) e mutante 48 horas após a reirrigação (Not R).

5.3 Preparação da Fração Microssomal

As vesículas de tonoplasto e de membrana plasmática foram isoladas de tecidos foliares através de centrifugação diferencial, como descrito por Giannini e Briskin (1987), com algumas alterações.

As amostras coletadas dos diferentes tratamentos foram homogeneizadas em meio de extração tamponado gelado, usando graal e pistilo. O tampão de extração é composto de 250 mM de sacarose, 10% de glicerol (p/v), 100 mM de KCl, 5 mM de EDTA (ácido etileno diaminotetracético) e 100mM de tampão Tris [tris-(hidroximetil) aminometano]-HCl, pH 8,0.

As soluções-estoque utilizadas na preparação foram mantidas em geladeira. Imediatamente antes do uso, foram adicionados, 5mM de DTT (ditiotreitól), 0,5% de PVPP (polivinilpiperidona), 0,3% de BSA (Albumina Sérica Bovina) (p/v), 2 mM de PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonil), 1mM de Benzamidina, 2% de ácido

ascórbico, tendo uma relação peso do tecido/volume de tampão de 1:2. Os procedimentos foram executados à temperatura de 4° C, e o pH do tampão de extração será monitorado e mantido na faixa de 7,5-8,0.

O homogenato resultante foi submetido à centrifugação a 1500 x g, durante quinze minutos para remoção de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi submetido à nova centrifugação, agora a 8.000 x g, por quinze minutos para remoção da fração mitocondrial. Em seguida o sobrenadante coletado foi centrifugado a 100.000 x g, por trinta minutos. O precipitado dessa centrifugação foi ressuspensionado em meio de ressuspensão contendo tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,6), glicerol a 10 %, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, Benzamidina 1 mM, e EDTA 5 mM.

5.4 Determinação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada em espectrofotometria a 595 nm (espectrofotômetro SHIMADZU UV – 120) – como descrito por Bradford (1976) utilizando BSA como proteína padrão.

5.5 Determinação da atividade hidrolítica das Bombas de H⁺

A atividades enzimáticas foram determinada colorimetricamente, segundo o método descrito por Fiske e Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição do substrato e finalizada pela adição de ácido tricloroacético (TCA) gelado para uma concentração final de 10% (v/v). A revelação do Pi hidrolisado foi realizada mediante a adição de 0,5 mL da mistura contendo molibdato de amônio 2% em H₂SO₄ 2 % + ácido ascórbico 1 % (100:1) e, após 15 minutos, efetuou a leitura em 750nm em leitor Quant (Biotec, USA). Nessa reação, o fosfato é incorporado em um complexo fósforo-molibdênio e reduzido pelo ácido ascórbico formando coloração azul. A composição do meio de reação: 50 mM de Hepes-Tris pH 6,5, 5 mM de MgSO₄, 100 mM de KCl, 0,2 mM de Na₂MoO₄, 2 mM de ATP e 0,03 mg.mL⁻¹ de proteína. Foram utilizados também inibidores específicos para as ATPases (Ortovanadato de sódio 5mM para a P-ATPase; Concanamicina 5nm para a V-ATPase). A atividade da pirofosfatase foi medida com ou sem KCl no meio de reação. As atividades hidrolíticas das bombas de prótons foram medidas com ou sem inibidor, e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída à enzima.

5.6 Monitoramento do gradiente de prótons

O gradiente de prótons foi medido como descrito por Michelis e Spanswick (1986), com algumas modificações propostas por Façanha e de Meis (1995), monitorando a taxa de decréscimo da fluorescência ($\Delta F/\text{min}$) da sonda fluorescente metacromática, 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA), excitada com um feixe de comprimento de onda de 415 nm e a emissão captada a 485 nm, utilizando-se um espectrofluorímetro.

O ACMA contém um grupo amina que funciona como uma base fraca, e assumindo-se que quando não protonado tem capacidade de atravessar livremente a bicamada lipídica da membrana. A protonação da base do grupo amina limita essa capacidade de movimento transmembranar. Então a sonda distribui-se através da membrana em função da diferença de pH entre o interior e o exterior das vesículas. O meio reacional será composto de 10 mM de Tris pH 6.5 ou 7,0, KCl 100 mM, ACMA 1,3 μM , MgSO_4 1 ou 3 mM e ATP 3 mM ou PPI 0,4mM e 50 μg de proteína. O gradiente será dissipado com NH_4Cl 1,5 mM.

5.7 Eletroforese em gel

As proteínas extraídas das folhas e raízes foram submetidas a eletroforeses em géis desnaturantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). A aplicação das amostras seguiu-se da seguinte forma: foi adicionada uma parte de tampão de amostra 4x (contendo SDS 2%, β -mercaptoetanol 4%, uréia 8M) para cada duas partes de extrato de proteína. Foi aplicado nos poços um total de 50 μl do extrato de proteína. As amostras foram submetidas à separação por eletroforese em SDS-PAGE. A separação protéica ocorreu sob uma corrente de 120 V até a linha de tampão de amostra chegar à parte inferior do gel. Posteriormente os géis foram revelados com azul brilhante de Coomassie R-250. As análises da mobilidade eletroforéticas e a quantificação relativa das bandas foram realizadas mediante varredura (scanner) do gel unidimensional obtendo uma imagem em formato TIFF em um software comercial e logo realizou-se um estudo densitográfico utilizando o programa computacional "GEL PERFECT" (Bozzo e Retamal, 1991, Retamal et al. 1999). A determinação da massa molecular relativa foi realizada relacionando a mobilidade das

proteínas das amostras em estudo, com aquelas de proteínas de massa molecular conhecida, utilizando o mesmo programa computacional.

5.8 WesternBlotting

As amostras de proteínas foram submetidas a uma eletroforese em gel SDS-PAGE (descrita no item 5.7). Após a eletroforese, as bandas protéicas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose utilizando-se tampão com 25 mM de Tris, 193 mM de glicina, 0,1% de SDS e 20% de metanol. A transferência foi feita em cuba Bio-Rad, por 3 horas, 350 Ma e 35 V. Após a transferência das bandas de proteínas, a membrana de nitrocelulose, foi incubada por 1 hora em uma solução constituída de leite em pó desnatado a 5% em tampão PBS (10 mM de tris-HCl pH 7,4 e 0,9% de NaCl), à temperatura ambiente sob agitação leve. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo H⁺-PPase, V-ATPase ou P-ATPase, diluído 1/1000 em leite em pó desnatado a 3% em tampão PBS, por 16 horas na temperatura de 2 a 8°C. Após este período, a membrana foi lavada 3 vezes (15 minutos em cada lavagem) em tampão PBS, sob agitação leve em temperatura ambiente e incubada com o anticorpo secundário diluído 1/1000 em leite em pó desnatado a 5% em tampão PBS, por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação suave, e seguida de 6 lavagens (15 minutos em cada lavagem) em tampão PBS. A banda da proteína contendo H⁺-PPase, V-ATPase ou P-ATPase foi revelada utilizando-se a solução reveladora (10g L⁻¹ DAB; imidazol 0,1M; Tris-HCl 1M pH7,5; H₂O₂ 30%).

5.9 Expressão relativa de RNAm

5.9.1 Extração de RNA total

Foram macerados 100-200 mg de material vegetal com auxílio de almofariz e pistilo, na presença de N₂ líquido. O macerado foi transferido para tubos de microcentrífuga (1,5 mL) novos e livres de RNase. Ao material foi adicionado 1mL do reagente TRIZOL (Life Technologies). Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12000xg por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Foi adicionado a este 500 uL de clorofórmio sendo o tubo levado a agitação por 2 minutos à temperatura ambiente. Logo após, foi realizada outra centrifugação a

12000 g por 15 minutos a 8°C, sendo o sobrenadante transferido para outro tubo, ao qual foi adicionado 500 uL de isopropanol. O material foi misturado por inversão e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 12000 g por 10 minutos a 4°C, descartando-se, em seguida, o sobrenadante. Foi adicionado 1 ml de etanol 75% sobre o sedimento resultante. A amostra foi novamente centrifugada, 7500 g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O sedimento foi seco a 37°C por aproximadamente 10 minutos, sendo posteriormente ressuscitado com 50 uL de água-DEPC. Uma alíquota (1 uL) de cada amostra de RNA total foi submetida à eletroforese em gel de agarose-DEPC 1% para quantificação, fotodocumentação e confirmação de qualidade. A integridade do RNA foi confirmada através de eletroforese com por intensidade ótica (DO). O material restante será armazenado em freezer -70°C até o momento de uso posterior. Foram extraídos RNA de dois experimentos independente

5.9.2 Transcriptase Reversa (RT) seguida da Reação em Cadeia da Polimerase

Foram utilizados 1-2 ug de RNA total para a produção de cDNAs. A síntese foi realizada com o kit *High capacity cDNA Reverse transcription* (Applied Biosystem, USA). O *primer* foi desenhado com o auxílio do programa *Primer3* e suas características avaliadas no programa *Oligocheck* e após análise rigorosa foram sintetizados pela *IDT technology*. A confirmação da especificidade do *primer* foi obtida em gel de agarose 2,0% com tampão TAE para a confirmação dos produtos de PCR.

As informações das seqüência dos *primers* utilizados encontram-se na tabela a seguir:

Definição da sequência	Sequencia do primer	
Vacuolar-typeH ⁺ - pyrophosphatase [Solanumlycopersicum], mRNAsequence	Forward	5'-GGCCTTGCCTTGGGTTACAAATCCG-3'
	Reverse	5'-GCATTCCAAGGGCAGCAACTGCAA-3'

Tabela 1. Informações das seqüências de *primers* utilizados nos experimentos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Plantas

O cultivo das plantas foi realizado em laboratório, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. As sementes foram semeadas em copos de 350ml, com substrato do tipo Brasplant®. Neste recipiente, as plantas foram cultivadas por 35 dias, e a irrigação foi realizada diariamente (Figura 1 A) e suspensa por 10 dias a partir do 35º dia (Figura 1 B).

Foi observado que microtomateiros ABA-mutantes crescem e se desenvolvem de maneira relativamente normal em condições de deficiência hídrica, assim como observado em *Arabidopsis* ABA-mutantes por Koorneef et al.1998, apresentando sintomas de desidratação como murchamento das folhas e consequente perda de turgescência em decorrência do déficit hídrico(Figura 1 B).

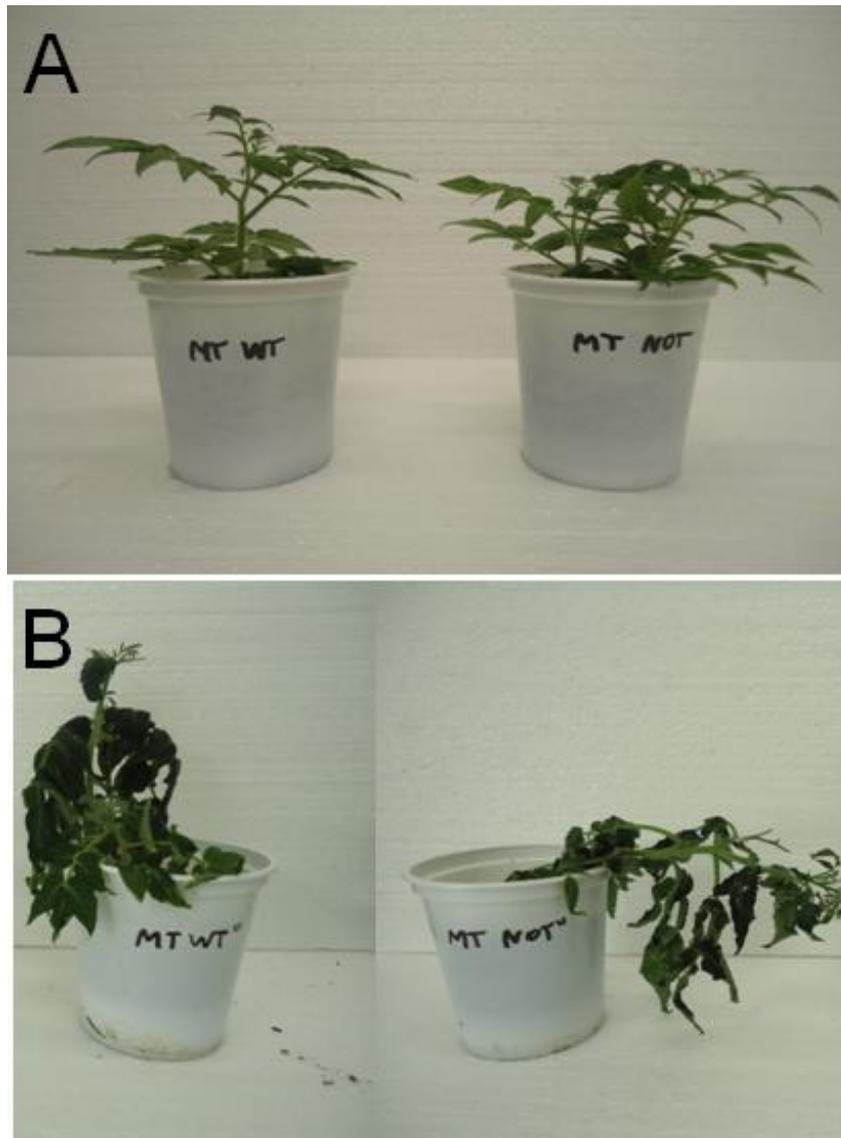


Figura 1: Microtomateiros WT e Not sob condições normais de irrigação (A) e submetidas ao déficit hídrico através de suspensão de irrigação por 10 dias (B).

6.2 Atividade hidrolítica das bombas de prótons

Foram observadas as atividades específicas in vitro das bombas de prótons em ambos os genótipos em condições normais de irrigação (WT e NOT); submetidas ao déficit hídrico através de suspensão da irrigação por 10 dias (WT 10d e NOT 10d) e 48 horas após a reirrigação (WT R e NOT R).

Na figura 2A foi observado no genótipo selvagem, um aumento de aproximadamente 4 vezes na atividade da H^+ -PPase em resposta ao estresse enquanto no mutante a atividade foi praticamente nula só apresentando aumento quando a planta foi reirrigada, porém em níveis bem inferiores quando comparadas ao WT reirrigado.

Em condições normais, a mutação não causou alterações relevantes na atividade da H^+ -PPase (figura 2 A), porém causou um aumento na atividade da V-ATPase (Figura 2B). O aumento na atividade da H^+ -PPase em resposta ao estresse acontece pois o pirofosfato (PPi) é um subproduto natural de várias reações biossintéticas e seus níveis permanecem estáveis na célula em condições de estresse, enquanto os níveis de ATP decaem (Buchanan et al., 2000).

Na figura 2B, observa-se que no selvagem a atividade da V-ATPase decresce com a indução do déficit hídrico e se mantém na mesma proporção após a reirrigação. Já o mutante Not apresentou atividade da V-ATPase 1,5 vezes mais elevada que o selvagem em condições normais de irrigação, durante o estresse observou-se uma queda brusca de aproximadamente 3 vezes na sua atividade e quando reirrigado não houve resposta da bomba mostrando uma atividade nula.

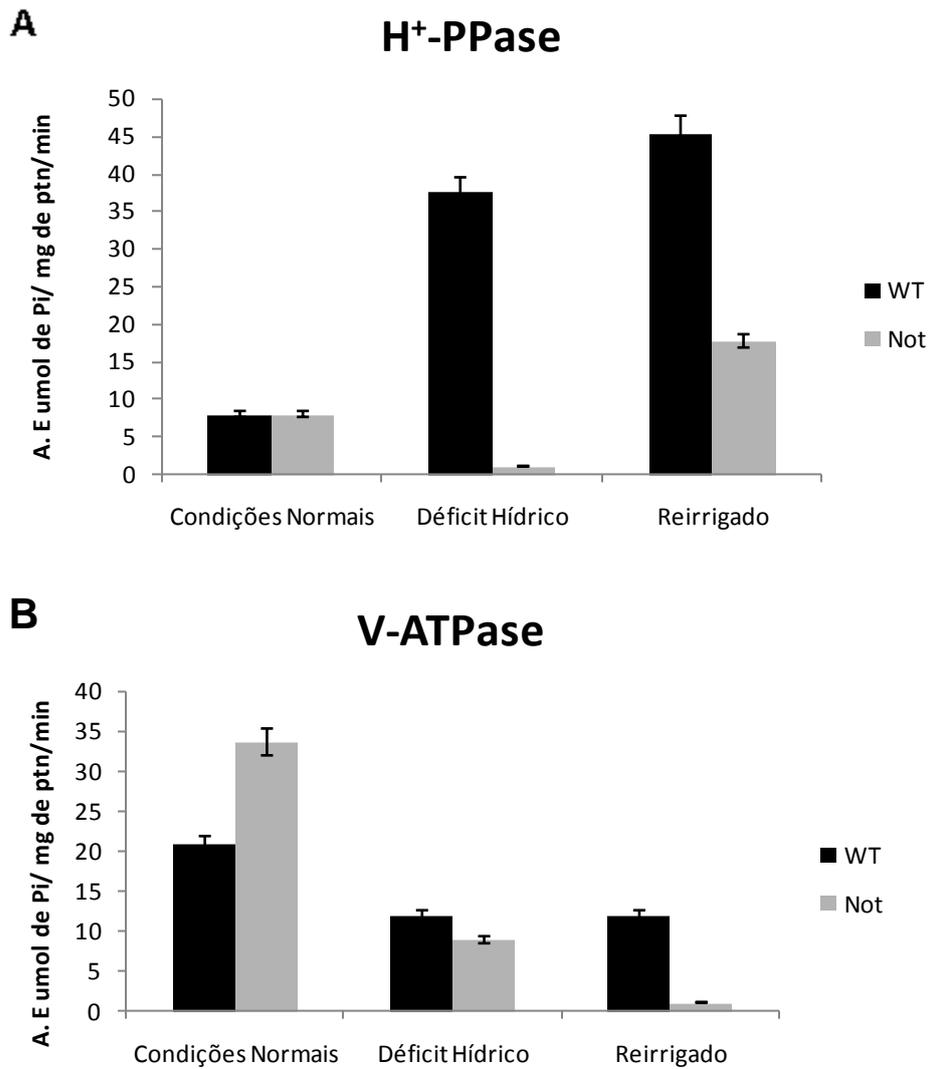


Figura 2: Atividade específica da H⁺-PPase (A) e V-ATPase (B) de vesículas microssomais isoladas de folhas de microtomateiros sendo controle sob condições normais de irrigação (WT); submetido ao déficit hídrico por suspensão da irrigação por 10 dias (WT 10d); 48 horas após a reirrigação (WT R); mutante sob condições normais de irrigação (Not); mutante submetido ao déficit hídrico por suspensão da irrigação por 10 dias (Not 10d) e mutante 48 horas após a reirrigação (Not R). Os dados são apresentados como média ± EP (n=3).

Existem diversos trabalhos acerca da participação do íon Ca^{2+} na sinalização iônica da célula vegetal em resposta a estresses. Este trabalho, no entanto, tem como finalidade caracterizar a participação das bombas de prótons não só como transdutores de energia, mas também como sistemas transdutores de sinal na resposta das plantas ao déficit hídrico.

Undurraga et al. (2009) observaram uma correlação positiva entre a H^+ -PPase e o trocador Na^+/H^+ de membrana plasmática SOS1, sugerindo sua participação na sinalização iônica na resposta das plantas a altas salinidades.

Nas figuras 2B e 3 é possível observar que a exposição ao déficit hídrico causou uma redução na atividade das bombas dependentes de ATP, isso se deve ao fato de que em condições de estresse hídrico os níveis de ATP decaem na célula pois trata-se de uma molécula cuja síntese requer gasto energético. Após a reirrigação observou-se uma recuperação na atividade da P-ATPase (Figura 3). Foi observado também que as plantas deficientes na produção de ABA apresentaram um padrão mais alto em seus níveis de atividade em todos os tratamentos sugerindo assim que o ABA possa atuar de maneira a inibir as H^+ -ATPases em nível bioquímico.

P-ATPase

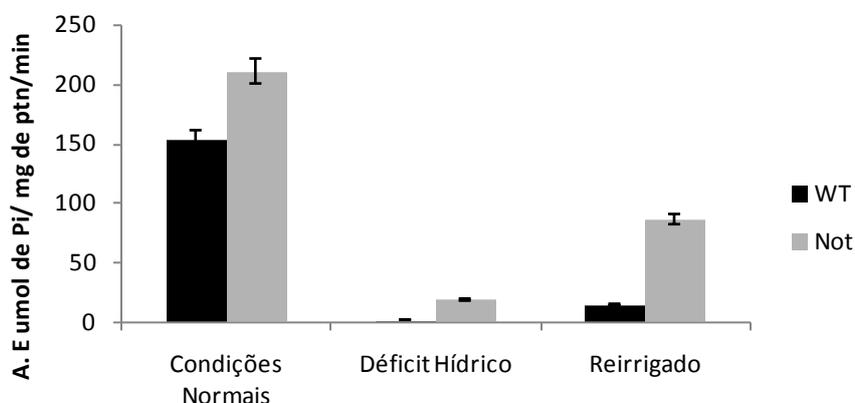


Figura 3:Atividade específica da P-ATPase de vesículas microsossomais isoladas de folhas de microtomateiros, sendo controle sob condições normais de irrigação(WT); submetido ao déficit hídrico por suspensão da irrigação por 10 dias (WT 10d); 48 horas após a reirrigação (WT R); mutante sob condições normais de irrigação (Not); mutante submetido ao déficit hídrico por suspensão da irrigação por 10 dias (Not 10d) e mutante 48 horas após a reirrigação (Not R).Os dados são apresentados como média \pm EP (n=3).

O papel do ABA presente em células guarda tem sua participação no processo de fechamento estomático bem estabelecido. O local de ação do ABA nas células guarda localiza-se na superfície do plasmalema destas células (Hartung, 1983). Isto significa que não é a concentração no interior das células, mas a concentração do ABA no apoplasto que rodeia as células guarda o fator que regula o fechamento estomático (Zambrano, 2004). Este fitormônio inibe a H^+ -ATPase de membrana e conseqüentemente inibe um canal de influxo de potássio, causando fechamento estomático e íon Ca^{2+} atua como mensageiro secundário neste processo (Zambrano, 2004), desta maneira a atividade da H^+ -ATPase apresenta sempre mais elevada no Not que do no WT, já que a principal característica do mutante Not é a não produção de ABA, independente se a planta se encontra sob déficit hídrico ou não (Figura 3), outro ponto observado também é que os sintomas de murchamento são mais proeminentes no Not do que no WT (Figura1).

6.3 Gradiente de prótons

O gradiente eletroquímico de prótons gerado pela H^+ -PPase foi mensurado analisando-se a velocidade inicial de transporte de H^+ e a variação da fluorescência máxima em ambos os genótipos submetidos ao déficit hídrico.

O estresse causou uma redução na velocidade inicial enquanto a mutação causou aumento de duas vezes neste parâmetro (Figura 4 A), porém tanto o estresse quanto a mutação apresentaram valores de fluorescência máxima mais altos que o controle (Figura 4 B), mostrando que a H^+ -PPase sustenta o gradiente através da membrana vacuolar tanto em resposta ao estresse quanto em função da mutação e aparece como principal responsável pela manutenção do gradiente eletroquímico de H^+ através da membrana vacuolar.

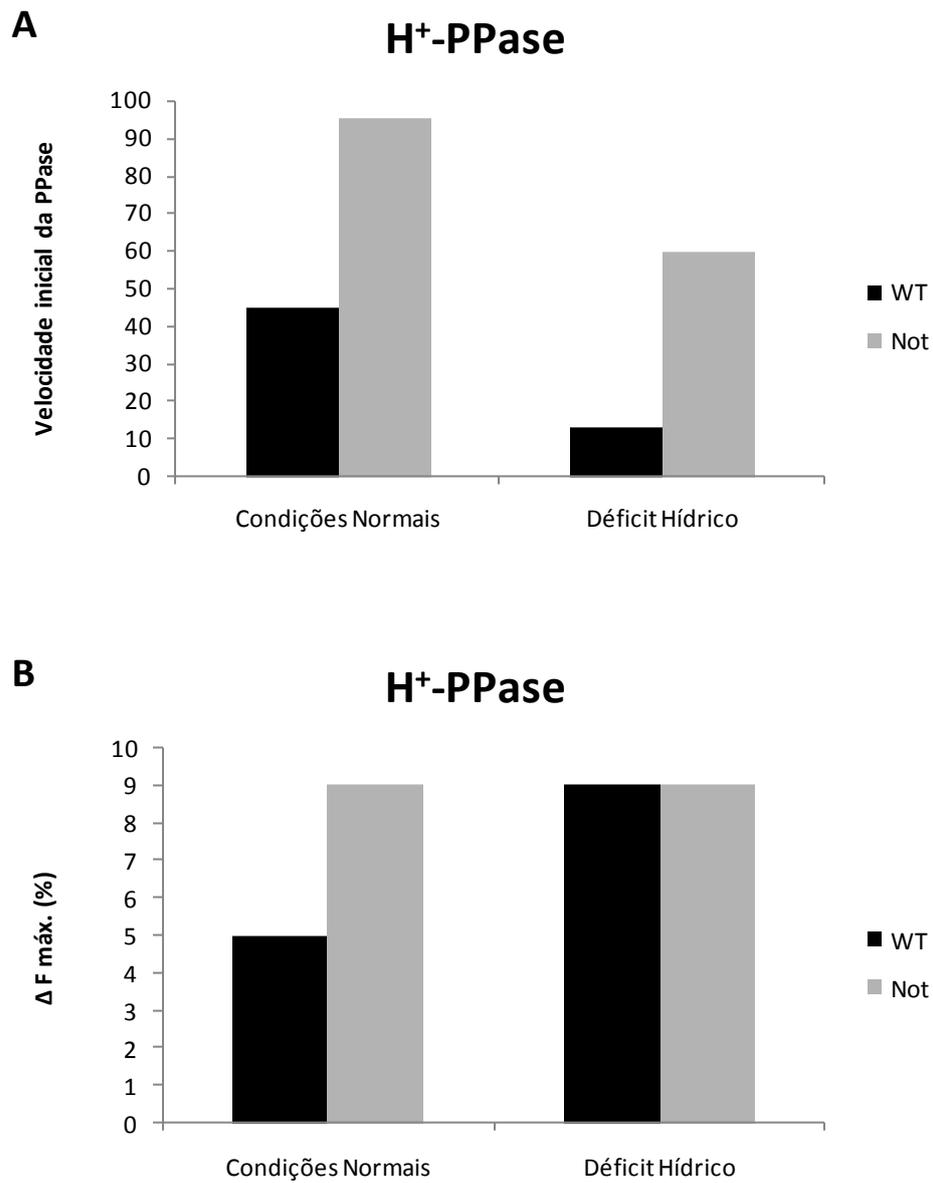


Figura 4: Transporte de H⁺ da PPase vacuolar em folhas de plantas do grupo controle e submetidas ao déficit hídrico. Velocidade inicial (A) e ΔF máx. (B).

6.4 Expressão de proteínas

Foram avaliadas através de imunodeteção por Western Blotting as expressões diferenciais das bombas de prótons em ambos os genótipos em condições normais de irrigação (WT e NOT) e submetidas ao déficit hídrico através de suspensão da irrigação por 10 dias (WT 10d e NOT 10d).

É possível observar nas figuras 5 e 6 que plantas com genomas diferentes apresentam um padrão de expressão protéica bastante diferente entre si, para as condições avaliadas.

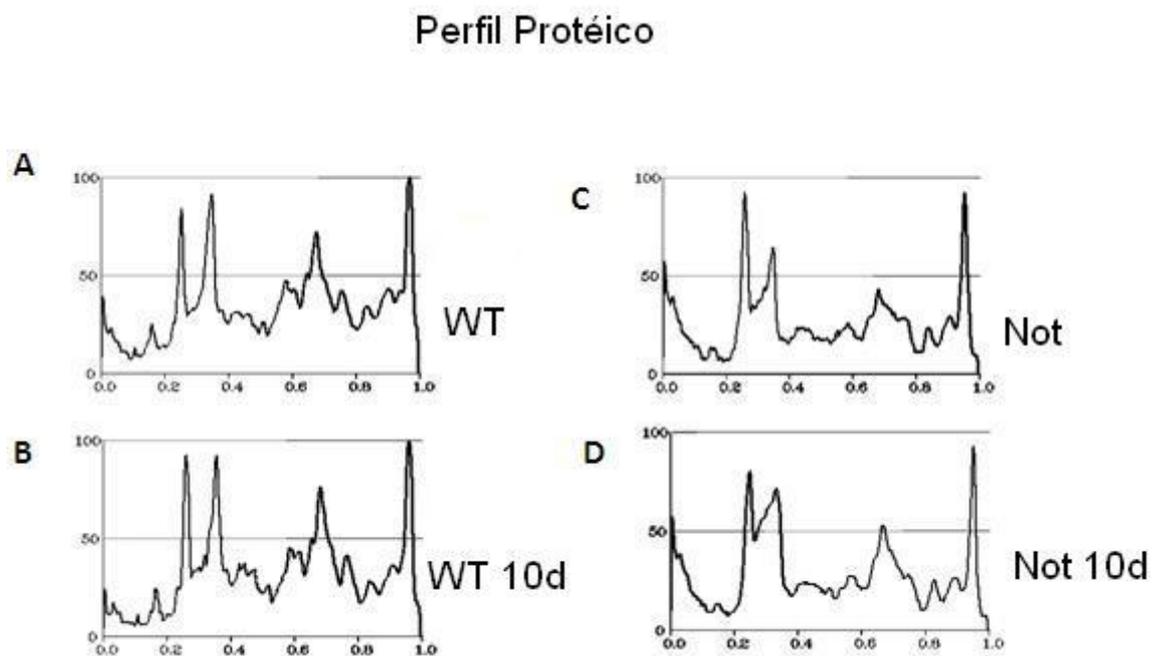


Figura 5: Perfil protéico expresso em tecidos foliares de microtomateiros de ambos genótipos em condições normais de irrigação (WT) e (NOT) e submetidas ao déficit hídrico através de suspensão da irrigação por 10 dias (WT 10d e NOT 10d)

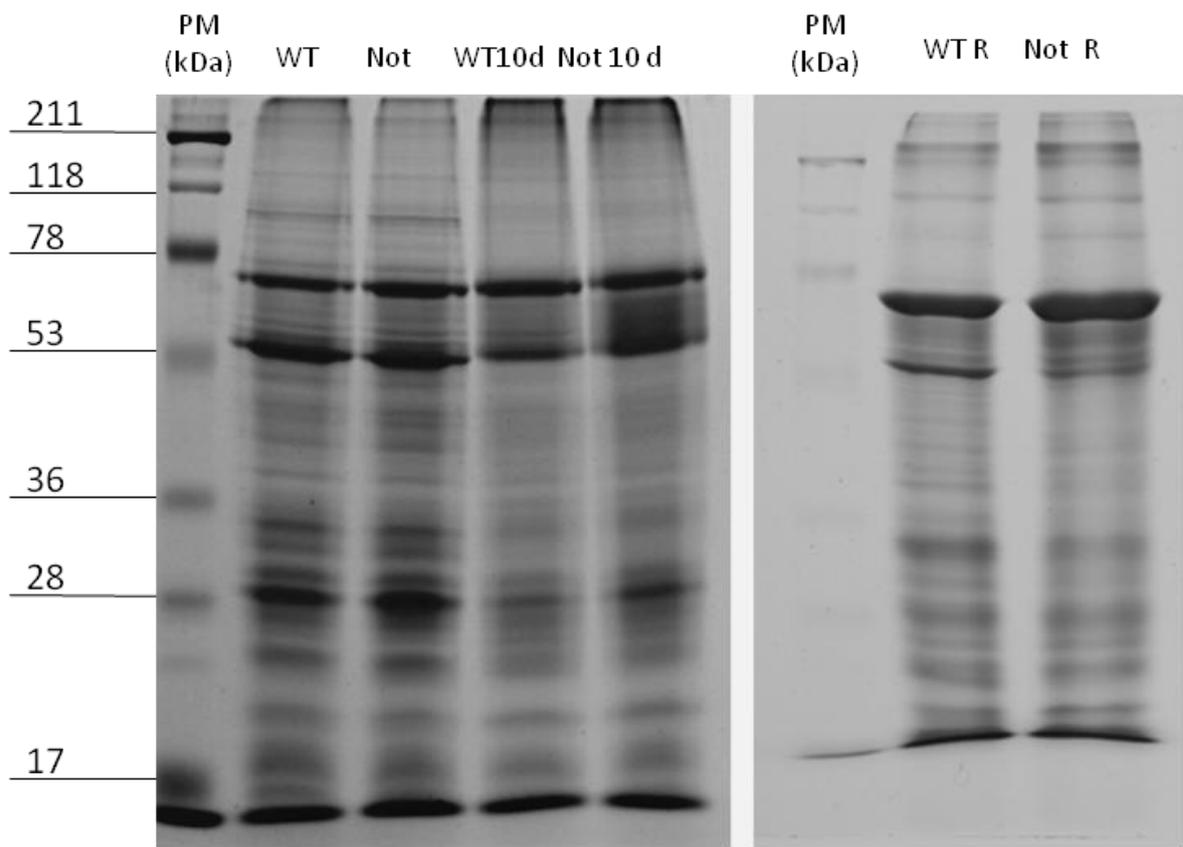


Figura 6: Gel SDS-PAGE 12 % de ambos os genótipos em condições normais de irrigação (WT e NOT); submetidas ao déficit hídrico através de suspensão da irrigação por 10 dias (WT 10d e NOT 10d) e 48 horas após a reirrigação (WT R e NOT R).

Estresses abióticos são capazes de alterar os níveis de proteínas na célula vegetal. Uma das funções mais cruciais para a sobrevivência da célula vegetal é a capacidade de responder a estresses desenvolvendo mecanismos de defesa, através da alteração nos padrões de expressão de diversas proteínas, modulando assim certas rotas metabólicas envolvidas nos processos de defesa. Tais proteínas podem atuar na transdução de sinal, atividades antioxidantes, respostas a extremos de temperatura, defesa contra patógenos e síntese de osmólitos. Entre as proteínas expressas diferencialmente em resposta a estresses, estão a superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, catalase, osmotina, MAPK quinases, proteínas da rota de sinalização SOS, proteínas envolvidas na sinalização de Ca^+ e ABA. (Zolla, 2007).

Os resultados apresentados na figura 7 mostram que o estresse causou uma redução de 2 vezes na expressão da H⁺-PPase e os mutantes Not quando reirrigados apresentaram uma expressão superior ao controle, sugerindo que tanto o estresse quanto a síntese de ABA tem influência na modulação da expressão da H⁺-PPase. Observa-se também que mesmo durante o déficit hídrico a H⁺-PPase no mutante Not se manteve mais elevada do que no Wt, mantendo-se maior durante a recuperação do déficit hídrico, indicando uma possível regulação desta enzima a pelo ABA, já que na ausência do fitormônio a enzima está sempre mais ativa.

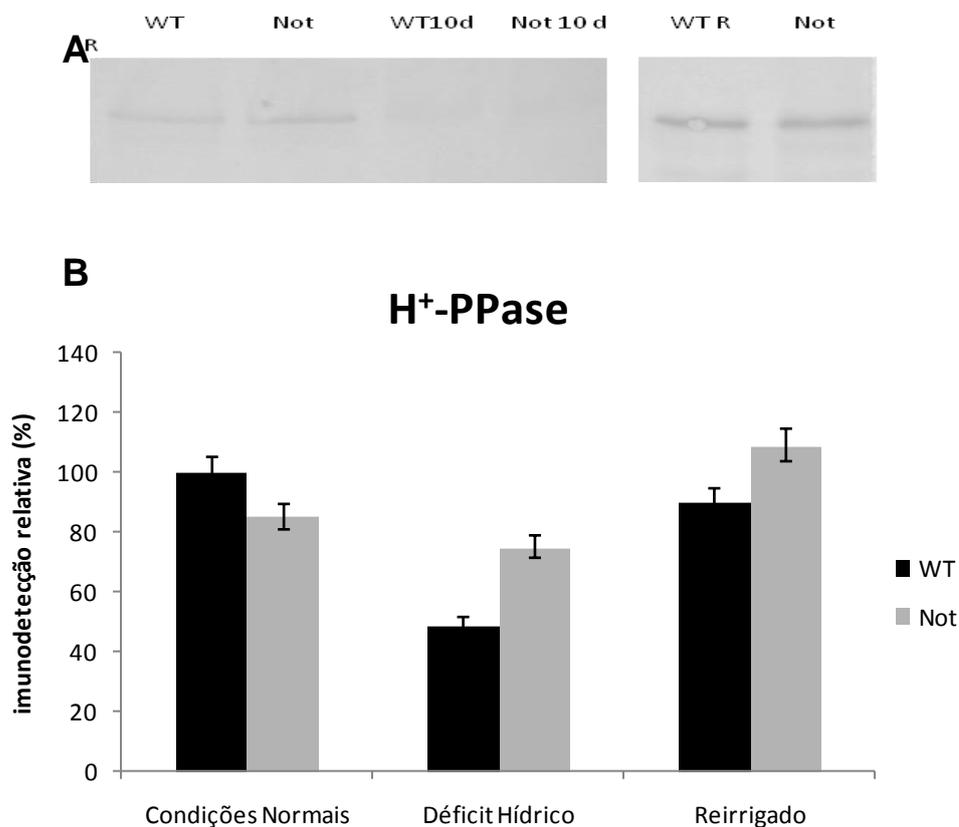


Figura 7: Análise dos níveis de expressão da H⁺-PPase, nas seguintes condições: condições normais de irrigação (WT e NOT); submetidas ao déficit hídrico através de suspensão da irrigação por 10 dias (WT 10d e NOT 10d) e 48 horas após a reirrigação (WT R e NOT R). (A) Imunodeteção por Western Blotting usando anticorpo contra H⁺-PPase; (B) Imunodeteção relativa. Os dados são apresentados como média ± EP (n=3).

A expressão diferencial da H⁺-PPase em sugere que esta enzima atua também na sinalização das respostas a estresses abióticos na célula vegetal.

A aplicação de ABA exógeno em plantas de tomateiros induziu um aumento na expressão da kitinase, uma proteína relacionada a proteção contra ataque a patógenos (Chen et al. 1994), reforçando a importância deste fitormônio na resposta das planta a diversos estresses.

Estudos anteriores demonstram que a superexpressão da H⁺-PPase em diferentes plantas como *Arabidopsis*, alfafa, trigo e tabaco induz um aumento na tolerância à alta salinidade e à seca. (Undurraga et al. 2011)

O estresse não alterou a expressão da V-ATPase do WT enquanto no Not houve uma leve redução, porém quando reirrigados tanto o WT quando o Not tiveram a expressão reduzida, mas a V-ATPase do WT teve a expressão mais reduzida do que o Not(Figura 8).

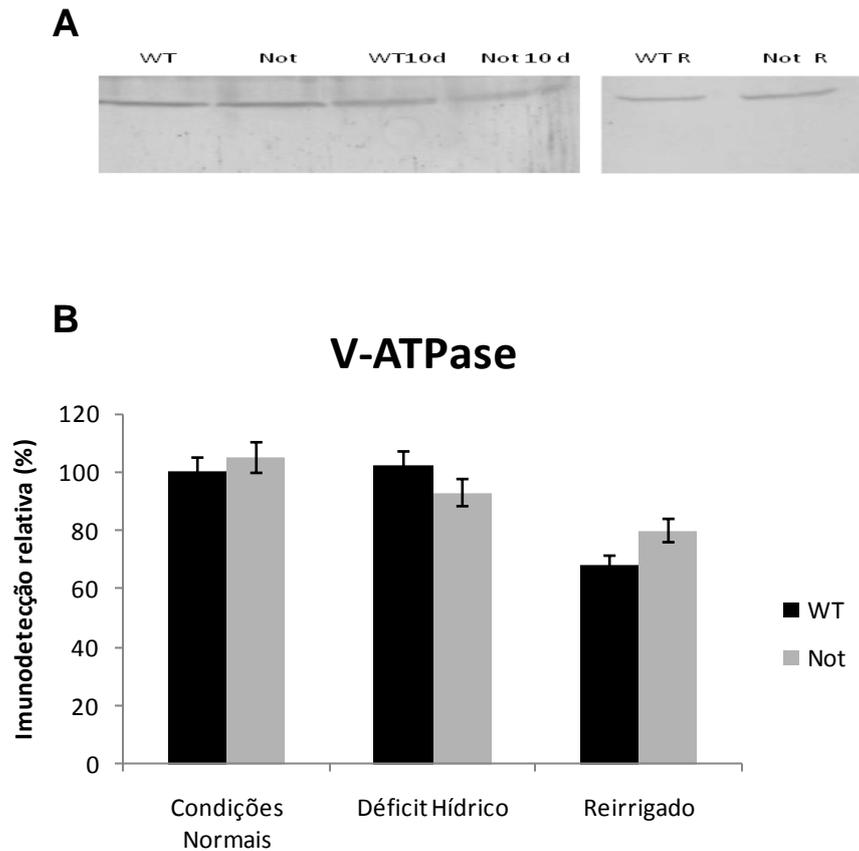


Figura 8: Análise dos níveis de expressão da V-ATPase, nas seguintes condições: condições normais de irrigação (WT e NOT); submetidas ao déficit hídrico através de suspensão da irrigação por 10 dias (WT 10d e NOT 10d) e 48 horas após a reirrigação (WT R e NOT R). (A) Imunodeteccção por Western Blotting usando anticorpo contra a subunidade B da V-ATPase; (B) Imunodeteccção relativa. Os dados são apresentados como média \pm EP (n=3).

Sobre a H⁺-ATPase de membrana plasmática, ambos estresse e mutação causaram redução na expressão, porém a redução causada pelo estresse foi muito superior a causada pela mutação como pode ser visto na figura 9.

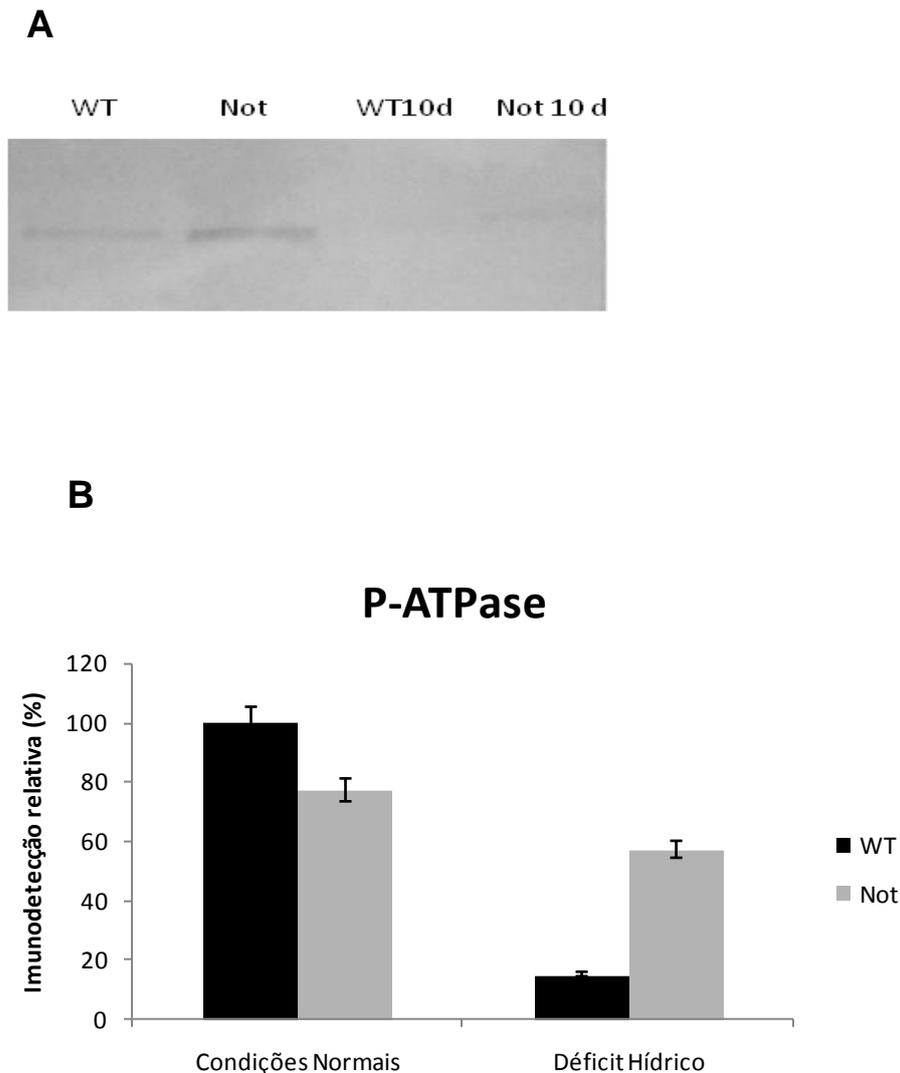


Figura 9: Análise dos níveis de expressão da P-ATPase, nas seguintes condições: condições normais de irrigação (WT e NOT); submetidas ao déficit hídrico através de suspensão da irrigação por 10 dias (WT 10d e NOT 10d) e 48 horas após a reirrigação (WT R e NOT R). (A) imunodeteção por Western Blotting usando anticorpo contra P-ATPase; (B) imunodeteção relativa. Os dados são apresentados como média \pm EP (n=3).

6.5 Expressão relativa de RNAm

A expressão relativa de RNAm transcrito pelo gene da H⁺-PPase foi avaliada através de RT-PCR. Na figura 10 é possível observar que o déficit causou um aumento nos níveis de transcritos da H⁺-PPase em ambos os genótipos (indicado por setas), mostrando que a deficiência hídrica induz um aumento na expressão desta enzima no nível molecular.

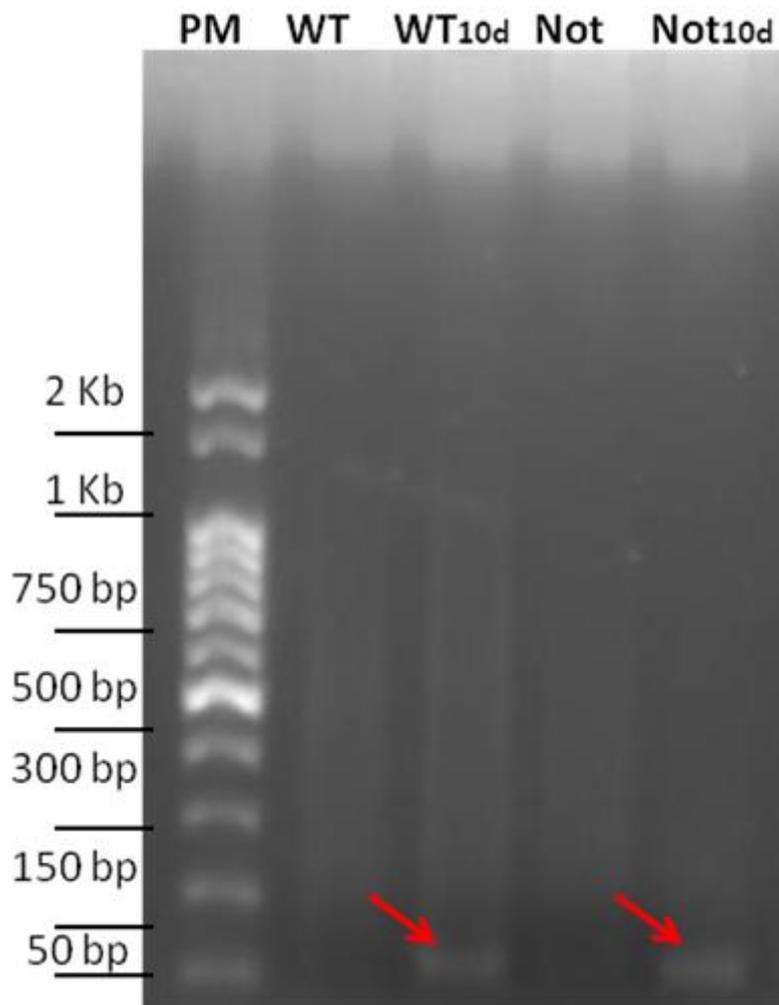


Figura 10: Expressão de RNAm da H⁺-PPase em tecidos foliares de ambos genótipos sob condições normais de irrigação (WT e NOT) e submetidos ao estresse hídrico (WT 10d e NOT 10d).

Estudos acerca do maquinário de biossíntese do ABA em vários procariotos e eucariotos, sugerem este fitormônio como uma molécula ancestral universal de resposta a estresses (Hauser et al., 2011; Seiler et al., 2011).

Sabendo-se que a maioria dos genes responsivos a biossíntese de ABA são regulados sob estresses abióticos. (Xiong e Zhu, 2003) e a superexpressão da H⁺-PPase do tipo IAVP1 (*cDNA de At1g15690*) confere maior tolerância a alta salinidade e à seca em *Arabidopsis* (Gaxiola, 2001), pode-se relacionar a expressão gênica desta enzima com as respostas adaptativas da célula, já que as respostas das plantas ao déficit hídrico são quase sempre acompanhadas pelo acúmulo de específicos transcritos de RNAm (Bray, 1988).

Tem sido observada uma relação entre os níveis de RNAm e a expressão de proteínas em cevada e arroz, porém as alterações nos níveis de RNAm nem sempre são seguidas por mudanças similares na proteína correspondente. LaRosa et al. (1992) demonstraram que em plantas de tabaco, a síntese de RNAm da proteína osmotina é induzida por ABA, etileno, salinidade, seca e ferimento causado na planta. Contudo, esta proteína só foi induzida em resposta ao estresse osmótico ou a aplicação de etileno. Já Reviron et al. (1992) demonstraram que a proteína BnD22 foi traduzida durante o estresse hídrico embora seu RNAm apareça tanto em plantas sob condições normais de irrigação quanto em plantas submetidas à seca.

7. CONCLUSÕES

- Diferentes genótipos de microtomateiros (WT e Not) apresentam atividades enzimáticas, expressão protéica e expressão gênica diferentes entre si em resposta ao déficit hídrico;
- O ABA inibe a atividade da ATPase de membrana plasmática e contribui para um aumento na eficiência da H⁺-PPase em resposta ao déficit hídrico, modulando esta enzima nos níveis pré e pós-transcricional.
- A capacidade de sintetizar ABA exerce influência direta na adaptação da célula vegetal ao déficit hídrico, pois este fitormônio atua na cascata de eventos bioquímicos e moleculares que envolvem a resposta das plantas aos estresses bióticos e abióticos de maneira geral.

8. REFERÊNCIAS

Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., Shinozaki, K. (1997) Role of Arabidopsis MYC and Homologs Drought - and Abscisic Acid - Regulated Gene Expression. *The Plant Cell*, 9:1859-1868.

Alberts, B.; Bray, D., Lewis, J.; Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1999) Cell signaling. In *Molecular Biology of the Cell*. 15:721-785.

Alvin, F. C., Carolino, S. M. B., Cascardo, J. C. M., Nunes, C. C., Martinez, C. A., Otoni, W. C., Fontes, E. P. B. (2001) Enhanced Accumulation of BiP in Transgenic Plants Confers Tolerance to Water Stress. *Plant Physiology*. 126:1042-1054.

Arteca, R. N. (1996) in: Plant growth substances: principles and applications. Chapman & Hall, New York, NY.

Bensen, R. J., Zeevaert J. A. D. (1990) Comparison of ent-kaurenesynthetase A and B activities in cell-free extracts from young tomato fruits of wild-type and *gib-1*, *gib-2* and *gib-3* tomato plants. *Journal of plant growth regulation*, v 9, p. 237-242,.

Bishop, G. J.; Fujioka, S.; Harrison, K.; Jones, J. D. G.; Kamiya, Y.; Noguchi, T.; Nomura, T.; Takatsuto, S.; Yokota, T. (1999) The tomato dwarf enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroids biosynthesis. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the U.S.A.* Washington, v. 96, p. 1761-1766,

Boyer, J. S. (1996) Advances in drought tolerance in plants. *Adv. Agron.* 56:187-218.

Bozzo S & Retamal C (1991). Gel-perfect: Geles unidimensionales, un nuevo método densitométrico para computadores personales. *Archivos de Biología y Medicina Experimentales*, 24: 181-184.

Bradford M.H. (1976). Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Brault, M., Amiar, Z., Pennarum, Anne-Marie., Monestiez, M., Zhanh, Z., Cornel, D.; Dellis, O., Knight, H., Bouteau, F., and Rona, Jean-Pierre. (2004) Plasma membrane depolarization induced by abscisic acid in Arabidopsis suspension cells involves reduction of proton pumping in addition to anion channel activation, which are both Ca^{2+} dependent. *Plant Physiology*, 135: 231-243.

Bray, E. A.(1988) Drought and ABA-induced changes in polypeptide and mRNA accumulation in tomato leaves. *Plant Physiol.* 88, 1210-1214

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

Bray, E. A. (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science.* 2:48-54.

Brenner, M.L., Jones, R.L. (1987) Distribution of abscisic acid in maize kernel during grain filling. *Plant Physiol.* 83:905--909.

Burbidge, A., Grieve, T. M., Jackson, A., Thompson, A., McCarty, D. R., Taylor, I. B. (1999) Characterization of ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize *Vp 14*. *The plant journal*, Oxford, v. 17, p. 427-431

Chaves,M.M. (1991) Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*, 42: 1-16.

Davies, W.J, Zhang, J.H. (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil.*Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*42:55-76.

Façanha, A. R., de Meis, L. (1995) Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. *Plant Physiology* 108: 241.

Finkelstein, R.R., Gampala, S.S.L., Rock, C.D.(2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings, *Plant Cell* 14, S15-S45.

Fiske, C.F., Subbarow Y., (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66: 375.

Fujino, D. W., Nissen, S. J., Jones, A. D., Burger, D. W., Bradford, K. J.(1988) Quantification of indole-3-acetic acid in dark-grown seedlings of *diageotropica* and *epinastic* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant physiology*, v. 88, p. 780-784.

Gaxiola, R. A, Li, J.,Undurraga,Dang, L. Allen, G., Alper, S., Fink, G. (2001) Drought-and salt- tolerant plants results from overexpression de AVP1 H⁺-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 11444-11449

Gaxiola, R.A., Palmgren, G. and Schumacher, K. (2007) Plant proton pump.*FEBS Letters*, 581:2204–2214

Giannini J.L., Briskin D.P. (1987) Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *Plant Physiology*, 84: 613.

Hare, P., Plessis, S. D., Cress, W.,Stade, J. V. (1996) Stress-induced changes in plant gene expression. *S. Afr. J. Sci.* 92:431-439.

Hartung, W. (1983) The site of action of abscisic acid at the guard cell plasmalemma of *Varianellalocusta*.*Plant Cell and Environment*, v.6, n.4, p.427-428

Hicks, G. R., Rayle, D. R., Domax, T. L., (1989) The *diageotropica* mutant of tomato lack high specific activity auxin binding sites. *Science*, New York, v. 245, p52-54

Koka, C. V.Cerny, R. E., Gardner, R. G., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., Clouse, S. D. (2000) A putative of tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response. *Plant Physiology*, Rockville, v.122 p. 85-98

Kelly, M. O., Bradford, K.J.,(1986) Insensitivity of the *diageotropica* tomato mutant to auxin. *Plant Phisiology*, v.82, 713-717

Koorneef, M.,Bosma, T. D. G.,Hanhart, C. J.,Vanderveen, J. H.,Zeevart, J.A. D.(1998) The isolation and characterization of gibberellins-deficient mutants in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*. Berlin, v. 80, p. 852-857,

Laemmli, UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.*Nature*, London. 227:680-685.

LaRosa,P.C.,Chen Z.,Nelson,D. E., Singh N. K., Hasegawa, P. M., Bressan R.A. (1992) Osmotin gene expression is posttranscriptionally regulated. *Plant Physiol.* 100 409-415.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. (1993) in: Principles of Biochemistry. *Worth Publishers*, New York, NY21-55

Liang, P., Pardee, A. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction.*Science.* 257:967-971

Logan, H., Basset, M., Very, A. A.,Setenac, H. (1997) Plasma membrane transport systems in higher plants: From black boxes to molecular physiology. *Plant Physiology* 100: 1.

Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalet, G., Ashri, A., Elkind Y., Levy, A. (1997) A new model system for tomato genetics.*The Plant Journal*, Oxford, v. 12, p. 1465-1472.

Nepomuceno A.L., Stewart J.M., Oosthuis D.M., Turley R., Neumaier N., Farias J.R.B. (2000) Isolation of a cotton NADP(H) oxidase homologue induced by drought stress. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 35(7):1407-1416.

Pratt, L. H., Cordonnier-Pratt, M.M; Kelmenson, P. M.; Lazaranova, G.I., Kubota, T., Alba, R.M. (1997) The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) *Plant Cell and Environment*, London, v. 20, p. 672-677,

Rea, P. A., Poole, R.(1993). Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase: A new category of ion translocase. *Trends in Biochemical Sciences, Volume 17, Issue 9* 348-353.

Retamal, C. A., Thiebaut, P, Alves, E. W. (1999) Protein purification from polyacrylamide gels by sonication extraction. *Anal. Bioch.* 268:15-20.

Reviron, M.P., Vartanian, N. Sallantin, M. J.C., Huet. J.C. Pernollet and D. de Vienne. (1992) Characterization of a novel protein induced by progressive or rapid drought and salinity in *Brassica napus* leaves. *Plant Physiol.* 100 1486-1493.

Rick, C. M., Yoder, J. I.(1988) Classical and molecular genetics of tomato: highlights and perspectives. *Annual Review of Genetics*, Palo Alto, v. 22, p. 281-300

Rock, C. D., Quatrano, R.S. (1995) The role of hormones during seed development. In: *Davies P.J. Plant hormones. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.* p. 671-697.

Sanders, D., Bethke, P. (2000) Membrane transport. In: *Biochemistry & molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. ASPP.* Rockville p 110-158.

Serrano, R.(1989) Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:61-94.

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (1996) Molecular responses to drought and cold stress. *Current Opinion in Biotechnology* 7:161-167.

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K..(1997) Gene expression and signal transduction in water stress response. *Plant Physiol.* 115:327-334.

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (1999) Molecular responses to drought stress. In: *Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants. Biotechnology Intelligence Unit, R.G. Landes Company, Austin, Texas, USA.*

Sreenivasulu, N., Radchuk, V., Strickert, M., Miersch, O., Weshcke, W., Wobus, U. (2006) Gene expression patterns reveal tissue-specific signaling

networks controlling programmed cell death and ABA-regulated maturation in developing barley seeds. *Plant J.* 47, 310-327

Stitt, M., Lilley, R.M.C., Gerhard, R., Heldt, H.W. (1989) Metabolic levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods of Enzymology* 174, 518–552.

Sze, H., Xuhang, L., Palmgren, M.G. (1999) Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11:677-689.

Taiz, L.; Zeiger, E. (1998) In: *Plant Physiology. 2nd ed.*, Sinauer Assoc., Sunderland, MA, 559.

Tanksley, S. (1993) Linkage map of tomato (*Lycopersicon esculentum*)(2N=24). In: O'Brien, J. (Ed.) Genetic maps: locus maps of complex genomes. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. p. 639-660.

Taylor, I. B., Burbidge, A., Thompson, A. J. (2000) Control of abscisic acid synthesis. *Journal of experimental botany*, Oxford, v 51, p. 1563-1574.

Umezawa, T., Fujita M., Fujita Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2006). Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 113-122.

Undurraga, S. F., Santos, M. P., Paez-Valencia, J., Yang, H., Hepler, P. K., Façanha, A. R., Hirschi, K. D., Gaxiola, R. A. (2012) Arabidopsis sodium dependent and independent phenotypes triggered by H⁺-PPase up-regulation are SOS1 dependent. *Plant Science*, v. 183 p. 96-105

Weiner H, Stitt M, Heldt HW (1987) Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline phosphatase in leaves. *Biochim Biophys Acta* 893: 13-21

Wilkinson, J. Q., Lanahan, M. B., Yen, H. C., Giovannoni, J. J., Klee, H. J., (1995) An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *never-ripe*. *Science*, New York, v. 270, p. 1807-1089,

Wu, Y., Kuzma, J., Maréchal, E., Graeff, R., Lee, H. C., Foster, R., Chua, N. (1997). Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* 278: 2126-2130.

Zambrano, O. D. B, (2004) Sinalização entre os sistemas radiculares e caulinares em genótipos contrastantes de *Lycopersicon* sob estresse por deficiência hídrica. Piracicaba,

Zandonadi, D.B., Canellas, L.P., Façanha, A.R. (2007) Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplastH(+) pumps activation. *Planta* (Berlin), v. 225, p. 1583-1595.

Zolla, L., Qadir, S., Qureshi, I, M. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants.(2007) *Journal of Plant Physiology* n. 164, p. 1239-1260