

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Avaliação da capacidade de genes de *Eucalyptus grandis* em conferir tolerância à  
deficiência hídrica**

**ANA PAULA KÖRBES**

**Dissertação submetida ao Programa de Pós  
Graduação em Genética e Biologia Molecular  
da UFRGS como requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre.**

**Orientador: Giancarlo Pasquali**

**Co-orientador: Maria Helena Bodanese-Zanettini**

**Porto Alegre**

**Março de 2006**

## **INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal, da Universidade Federal do Rio grande do sul (UFRGS).

Fontes financiadoras deste trabalho: financiamento a projeto de pesquisa, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCT); bolsa de mestrado, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Projeto GENOLYPTUS.

Financiamento do Projeto GENOLYPTUS: Fundo Setorial Verde-Amarelo do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) e as empresas de celulose e papel (1) Aracruz Celulose S.A., (2) Grupo Raiz, (3) Ferro-Gusa Carjás S.A., (4) Celulose Nipo-Brasileira S.A. – CENIBRA, (5) International Paper do Brasil Ltda., (6) Jarí Celulose S.A., (7) Klabin S.A., (8) Lwarcel Celulose e Papel LTDA., (9) Veracel Celulose S.A., (10) Votorantim Celulose e Papel S.A., (11) Zanini Florestal S.A., (12) Suzano-Bahia Sul Papel e Celulose S.A. e (13) Vallourec & Mannesmann do Brasil S.A.

**À vida, e a todos que a tornam mais especial...dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Giancarlo Pasquali, por toda a sua dedicação e atenção, mas também por ter acreditado (e me convencido a acreditar!) na minha capacidade de desenvolver este trabalho.

À minha querida co-orientadora, Maria Helena Zanettini, por sempre ter me incentivado a seguir em frente.

Ao prof. Rogério Margis, pelo indispensável auxílio com os experimentos de PCR em tempo real.

Ao Felipe (FFF), pela ajuda com os Southern e Northern blots. À Jacque e Débora, por toda a ajuda, conselhos e sugestões durante a realização deste trabalho. À Danielle, pelo auxílio com a transcrição reversa. À Rochele, Fernanda B., Fernanda S, pelo companheirismo e auxílio na rotina do laboratório. Agradeço também pela amizade gratuita que essas pessoas especiais me ofereceram, me apoiando tanto nos momentos alegria quanto nos de dúvida e de tristeza.

Ao prof. Arthur e à Joseli Schwambach, pelo auxílio com a cultura in vitro de *Eucalyptus grandis*.

À Sílvia Richter, Ricardo Weber e Augusto Uberti, pelo auxílio com a cultura in vitro de soja e experimentos de transformação.

Aos colaboradores na Aracruz Celulose e Papel S.A, João Bauer e Norton Borges, pelo auxílio nas coletas de material a campo.

À prof. Maria Luísa do Hospital de Clínicas, pelo empréstimo do termociclador para análises de PCR em tempo real.

Ao Centro de Biotecnologia da UFRGS, em especial o LBMV, pela infra-estrutura.

Ao projeto GENOLYPTUS e seus agentes financiadores Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) e empresas de celulose e papel, por viabilizarem a execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCT), pelo financiamento ao projeto de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Ministério da Educação), pela bolsa de mestrado.

À minhas amigas Sandra, Anelise, Beatriz e Gecele, que incansavelmente me ouviram contar muitas histórias sobre este período, me ajudando com todo o otimismo a superar cada etapa.

Aos meus pais queridos, que me proporcionaram todas as condições que estavam ao seu alcance para a realização deste e de todos os projetos da minha vida.

Ao meu amor e grande amigo, Tom, pelo confortável abraço que me consolou quando precisei e por toda a compreensão com minhas longas horas de ausência em função do trabalho.

## SUMÁRIO

Capítulo I- INTRODUÇÃO.....	12
Capítulo II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1. A seca, a agricultura e a biotecnologia.....	16
2. Respostas metabólicas vegetais ao estresse hídrico.....	17
2.1 Percepção vegetal do estímulo de estresse hídrico e sinalização.....	21
2.2 Controle da transcrição de genes vegetais em resposta ao estresse hídrico.....	23
2.3 Respostas adaptativas das plantas ao estresse hídrico.....	26
2.3.1 Detoxificação.....	27
2.3.2 Osmoproteção.....	28
2.3.3 Chaperonas.....	31
2.3.4 Osmorregulação.....	32
3. Melhoramento de plantas para a tolerância à seca.....	34
3.1 Alterações na percepção, sinalização do estímulo e no controle transcricional.....	35
3.2 Alterações em genes funcionais e estruturais.....	38

Capítulo III- Cloning and characterization of <i>Eucalyptus</i> cDNAs encoding S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC).....	50
Capítulo IV- Cloning and characterization of a <i>Eucalyptus</i> cDNA encoding a mitogen-activated protein kinase (MAPK).....	83
Capítulo V- DISCUSSÃO GERAL.....	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (Capítulos I, II e V).....	118
ANEXOS.....	132
I.....	132
II.....	134
III.....	136
IV.....	138
V.....	140
VI.....	142

## RESUMO

Uma cuidadosa revisão bibliográfica, seguida por uma pesquisa *in silico* no banco de dados de *expressed sequence tags* (ESTs) do projeto GENOLYPTUS – Rede Brasileira de Pesquisa do Genoma de *Eucalyptus*, foram realizadas visando identificar classes de genes potencialmente relacionadas com a resposta vegetal à deficiência hídrica em *Eucalyptus grandis*. Os principais clones de cDNA selecionados potencialmente codificam proteínas relacionadas com a síntese de osmólitos como prolina, sacarose, osmotina, poliaminas, desidrinas, fatores de transcrição, e genes de uma importante cascata de sinalização vegetal à deficiência hídrica. Duas classes de seqüências foram estudadas mais detalhadamente. A S-adenosil-metionina-descarboxilase (SAMDC) é uma enzima-chave na rota de síntese das poliaminas, aminas catiônicas envolvidas em vários processos celulares, inclusive na proteção das estruturas da célula em respostas a diferentes tipos de estresses. Dois grupos de ESTs foram inicialmente identificados por homologia a seqüências conhecidas de SAMDC e duas seqüências potencialmente completas de cada grupo foram selecionadas e denominadas *EgrSAMDC1* e *EgrSAMDC2*. As seqüências deduzidas de aminoácidos de ambos os cDNAs apresentaram os dois principais domínios da enzima e uma estrutura conservada em relação a outras SAMDCs de plantas. Além da região de leitura aberta (ORF, do inglês, *open reading frame*) principal, os cDNAs apresentaram duas pequenas regiões codificadoras conservadas, denominadas *tiny* e *small upstream ORFs* na longa região 5' não traduzida, relacionadas à regulação pós-transcricional dos genes. Em análises de *Southern blot*, foram detectados pelo menos dois fortes sinais de hibridização para cada amostra de DNA genômico de *E. grandis* digerido por endonucleases distintas, sugerindo a existência de (pelo menos) duas cópias genômicas de SAMDC. Por *Northern blots*, a presença de mRNAs para SAMDC foi detectada em folhas e caules jovens e, em menor quantidade, em tecidos vasculares de árvores adultas. Entretanto e nitidamente, a maior expressão de *SAMDC* em *E. grandis* ocorre em flores abertas. Análises quantitativas por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da DNA-polimerase (qRT-PCR) com plântulas cultivadas *in vitro* por 4 meses, submetidas a diferentes tratamentos como ácido abscísico (ABA), ácido naftalenoacético (ANA), quinetina (KIN), cloreto de sódio (NaCl), seca, frio, luz ultravioleta (UV), ferimentos e extrato de leveduras,



demonstraram maior indução da expressão de *EgrSAMDC2* na presença de ABA e NaCl. Também foi observada uma drástica redução na expressão deste gene, baseado nos níveis de mRNA-molde para as RT-PCRs, quando as plântulas foram expostas a UV e seca. Estes resultados indicaram que o gene *EgrSAMDC2* pode estar mais relacionado à resposta vegetal à elevada salinidade, por intermédio da sinalização por ABA, do que à resposta a outros estresses ambientais ou bióticos.

A segunda classe de genes identificados e analisados junto ao GENOLYPTUS como potencialmente relacionados à deficiência hídrica potencialmente codificam proteína-cinases ativadas por mitógenos (MAPKs, do inglês, *mitogen-activated protein kinases*). MAPKs são proteínas de uma importante cascata sinalizadora, constituída por três componentes denominados MAPKKK, MAPKK e MAPK. Elas estão envolvidas na sinalização do desenvolvimento, estímulos hormonais e de estresses bióticos e abióticos. O cDNA selecionado, de aproximadamente 5 kb, representa uma seqüência imatura de mRNA (transcrito primário), no qual estão presentes dois íntrons. Nas extremidades 5' e 3' dos íntrons existem sítios canônicos de processamento (*splicing*) que indicam que o transcrito deve ser corretamente processado em um mRNA maduro. A proteína deduzida a partir da união dos éxons indica que o cDNA isolado de *E. grandis* potencialmente codifica uma MAPK2, com alta homologia a outras MAPKs vegetais. Além disto, a seqüência de aminoácidos representa uma proteína completa, na qual os 11 domínios conservados em MAPKs, fundamentais para o correto funcionamento da enzima, estão presentes. Análise de *Southern blot* indicaram que este gene está presente em cópia única no genoma de *E. grandis*. Em análises da expressão por qRT-PCR em plântulas submetidas aos diferentes tratamentos descritos acima, foi observado uma significativa indução da transcrição com KIN e NaCl, e uma leve indução por ABA. O tratamento com UV provocou uma drástica redução na expressão de *EgrMAPK2*. Este resultado fornece indícios de que este gene possivelmente esteja envolvido em repostas a estresses abióticos.

## ABSTRACT

A careful bibliographical review, followed by an *in silico* screening of the *expressed sequence tag* (EST) databank of the GENOLYPTUS Project – The Brazilian Research Network on the *Eucalyptus* Genome, were conducted to identify genes potentially related to drought responses in *Eucalyptus grandis*. The main selected clones potentially encode proteins related to the biosynthesis of different osmolites such as proline, sucrose, osmotin and polyamines, dehydrines, transcription factors and genes from an important plant signaling cascade. Two gene classes were studied in more detail. S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) is one of the key regulatory enzymes in the biosynthesis of polyamines, cationic amines involved in various processes of the cell, including the protection of cellular structures in response to different stresses. Two clusters of ESTs were initially identified by homology to known SAMDC sequences and, from each of them, two full-length cDNAs were identified and named *EgrSAMDC1* and *EgrSAMDC2*. The deduced amino acid sequences from both cDNAs showed the two main enzyme domains and a conserved protein structure in comparison to other plant SAMDCs. Besides the main open reading frame (ORF), two other tiny and small upstream ORFs were found in the long 5' non-translated region of the cDNAs. These sequences are known to be associated with post-transcriptional regulation. Southern blot analysis resulted in two strong hybridization signals for each genomic DNA digested with different restriction enzymes, indicating (at least) two SAMDC genomic copies. Northern blots detected SAMDC mRNAs in young leaves and stems and a lower transcript level in vascular tissues from mature trees. Nevertheless, the highest levels of *E. grandis* SAMDC steady-state mRNA was clearly detected in opened flowers. Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) with total RNA from 4-months old *in vitro* seedlings subjected to different treatments, such as abscisic acid (ABA), naphthaleneacetic acid (NAA), kinetin (KIN), sodium chloride (NaCl), drought, cold, ultraviolet light (UV), wounding and yeast extract, demonstrated higher expression induction of *EgrSAMDC2* gene with ABA and NaCl. A drastic reduction in gene expression was observed after UV and drought treatments of the seedlings, based on RNA-template levels for RT-PCRs. These results suggested that

*EgrSAMDC2* gene might be more related to plant response against high salinity, possibly via ABA signaling, than to other environmental or biotic-like stress responses.

The second gene class identified and analyzed in the GENOLYPTUS, as potentially involved in drought responses, encodes a mitogen-activated protein kinase (MAPK). MAPKs proteins are part of an important signaling cascade, which consists of three components, MAPKKK, MAPKK and MAPK. They are associated to developmental signaling, hormonal and biotic and abiotic stimuli. The selected cDNA, of about 5 kb in length, represented an immature mRNA (primary transcript) with two non-spliced introns. The canonical 5' and 3' splicing sites suggested that the transcript might probably be correctly translated to a mature mRNA. The deduced protein from the union of all three exons indicated that the isolated *E. grandis* cDNA potentially encodes a MAPK2, with high homology to other plant MAPKs. Moreover, the amino acid sequence represented a complete protein, with all 11 domains conserved in MAPKs and known to be fundamental for the enzyme functionality. Southern blot analysis indicated that *EgrMAPK2* is encoded by a single genomic copy in *E. grandis*. From qRT-PCR expression analysis, conducted with the same plant material described above, we observed a significant transcription induction with KIN and NaCl, and a weaker induction by ABA. The UV treatment resulted in a drastic reduction of *EgrMAPK2* expression. This result strongly indicated that this gene is most probably involved in abiotic stress responses.

## I- INTRODUÇÃO

Seca, alta salinidade e baixas temperaturas são três importantes fatores abióticos comumente enfrentados pelas plantas em seus ambientes nativos. Para transpor as limitações de crescimento e sobrevivência impostas por estes fatores, as plantas desenvolveram variadas adaptações genéticas, bioquímicas e fisiológicas (Bray, 1997; Zhu, 2002). Diante destes estímulos estressantes, muitos genes são induzidos e os produtos codificados por eles têm sido relacionados com funções de proteção celular, como detoxificação de espécies reativas de oxigênio e proteção de estruturas protéicas (Thomashow, 1999; Hoekstra *et al.*, 2001). Além das funções óbvias de proteção, muitos estudos têm identificado importantes rotas de ativação dos genes envolvidos na resposta adaptativa final (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Zhu, 2001; Fujita *et al.*, 2005; Boudsocq e Laurière, 2005), os quais têm revelado uma complexa e intrincada rede de respostas gênicas que existe desde a percepção e reconhecimento do sinal de estresse até a ativação dos genes de resposta final (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Seki *et al.*, 2003; Kacperska, 2004).

No Rio Grande do Sul, a agricultura representa o setor econômico mais importante do Estado, baseado principalmente nas culturas de soja, milho e arroz, cultivadas durante o verão. No entanto, no histórico de produção dos últimos anos, episódios cada vez mais frequentes de estiagem têm sido registrados, invariavelmente resultando em perdas significativas da produtividade para os agricultores e para a economia da região. Esse fato tem evidenciado a necessidade do cultivo de variedades mais tolerantes às novas condições locais e estimulado pesquisas com esta finalidade. A principal dificuldade deste processo consiste na obtenção de germoplasma com adaptações à seca para ser utilizado nos programas convencionais de

melhoramento, baseados em cruzamentos intra-específicos. Ferramentas biotecnológicas, como a transformação genética, surgem como importantes alternativas para obtenção de fontes de variação genética (Wang *et al.*, 2003). Assim, a identificação de genes com potencial em conferir características de maior tolerância ao déficit hídrico adquire elevada relevância e valor estratégico para a manutenção da produtividade agrícola em condições climáticas desfavoráveis (Chaves e Oliveira, 2004).

O eucalipto é uma espécie arbórea nativa da Austrália, um dos países mais áridos da Terra e, por esta razão, adaptado a períodos anuais de seca. Devido a suas características agronômicas, esta arbórea vem ganhando espaço em plantações introduzidas em vários países, como o Brasil, principalmente para a extração de celulose e produção de madeira e papel. O Brasil detém cerca de 40% da área mundial plantada com eucalipto, é o quinto maior produtor mundial de pasta de celulose e papel e possui os índices de produtividade mais altos do planeta, graças à qualidade única dos programas brasileiros de melhoramento genético (Neilson, 2000; FAO, 2003). Em 2004, e durante toda a última década, a pasta de celulose e o papel constituíram-se, para a exportação brasileira, no segundo ou terceiro mais importante artigo industrializado produzido no país, sendo superado apenas por automóveis e aviões, dependendo do ano (AEB, 2006). Entre as centenas de espécies e híbridos existentes, *Eucalyptus grandis* é uma das espécies de maior importância comercial, utilizada como base principal em vários programas de melhoramento genético ao redor do mundo, principalmente por suas características de rápido crescimento e alta densidade da madeira (Neilson, 2000; FAO, 2003).

Em vista da relevância do eucalipto para a economia brasileira, em fevereiro de 2002 foi iniciado um projeto visando o seqüenciamento de todos os genes expressos de espécies-chave desta arbórea, intitulado GENOLYPTUS – Rede Brasileira de Pesquisa do Genoma de *Eucalyptus*. Além do conhecimento do transcriptoma de *Eucalyptus*, com igual ênfase, o projeto possui como foco análises genéticas a partir de diversos cruzamentos interespecíficos, marcadores moleculares, análises químicas e físicas da madeira, estudos bioquímicos e fisiológicos, todos integrados por ferramentas de bioinformática.

Junto ao sub-projeto direcionado à análise do transcriptoma, várias bibliotecas de cDNA foram construídas a partir de diferentes tecidos, órgãos e plântulas de diferentes espécies de

*Eucalyptus*, permitindo a geração, a partir do seqüenciamento dos clones de cDNA, de um banco de dados com mais de 120.000 seqüências válidas depositadas. Na segunda fase do projeto, o Laboratório de Biologia Molecular Vegetal do Centro de Biotecnologia da UFRGS, como um dos grupos integrantes do GENOLYPTUS, e juntamente com diversos outros laboratórios, passou à exploração dos dados disponíveis. Desta forma, genes potencialmente relacionados com alguma característica específica, como a resposta a estresses abióticos, podem ser identificados na coleção de ESTs (*Expressed Sequence Tags*, ou seqüências-marcas de genes expressos) a partir da homologia de suas seqüências ou pelo padrão de suas expressões, e estudados para a comprovação de suas funções. Os genes identificados poderão ser, futuramente, utilizados para diversas finalidades como, por exemplo, o melhoramento de plantas por meio de suas super-expressões ou inibições por transgenia, ou como marcadores genéticos em programas convencionais de melhoramento.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como principal objetivo identificar genes potencialmente relacionados à resposta à deficiência hídrica em plantas de eucalipto e a caracterização funcional de pelo menos um dos clones identificados. Os objetivos específicos foram:

- Realizar o levantamento bibliográfico e selecionar, na literatura, genes candidatos, potencialmente relacionados à resposta vegetal à seca;
- Recuperar, a partir da coleção de plasmídeos pSPORT1 purificados do Projeto GENOLYPTUS, o(s) clone(s) selecionado(s), e obter e caracterizar a(s) seqüência(s) completa(s) do(s) mesmo(s);
- Analisar a estrutura e o padrão de expressão do(s) gene(s) selecionado(s).

Assim, uma cuidadosa revisão bibliográfica, que constitui o Capítulo 2 da presente Dissertação, foi realizada visando identificar as principais classes de genes vegetais potencialmente relacionadas com a resposta à deficiência hídrica. As classes de genes dos principais candidatos selecionados codificam proteínas relacionadas com a síntese de osmólitos como prolina (P5CS); sacarose (SPS); osmotina; poliaminas (ADC, ODC, SAMDC); desidrinas (RAB18, XERO2); fatores de transcrição (DREB1A, DREB1B, DREB2A, DREB2B); e genes de uma importante cascata de sinalização vegetal à deficiência

hídrica (MAPKKK, MAPK). Maiores detalhes sobre todas estas classes de proteínas e genes encontram-se no Capítulo 2.

A partir dos resultados de anotação automática da potencial identidade funcional das seqüências depositadas no banco de dados do GENOLYPTUS (Laboratório de Genômica e Expressão Gênica, Universidade de Campinas, <http://www.lge.ibi.unicamp.br/eucalyptus/>; Laboratório de Bioinformática, Universidade Católica de Brasília, <http://www.genoma.ucb.br/SistemaGenoma/>), foram identificadas seqüências únicas (*singlets*) de ESTs ou grupos de seqüências (*clusters*) potencialmente codificadores de proteínas de *Eucalyptus* relacionadas às classes acima listadas (Anexo 1). Após a reunião de todas estas seqüências disponíveis no banco de dados do GENOLYPTUS, foram selecionados clones de cDNA potencialmente completos, isto é, caracterizados pela presença do códon de início de tradução ATG. Considerando que os cDNAs foram gerados a partir de oligonucleotídeos com complementaridade às caudas de poli(A), subentende-se que todos os produtos de síntese, ou a sua maioria, possuem a região 3'-terminal e, por conseguinte, os códon de terminação da tradução. Finalmente, clones representantes de duas classes de genes, *MAPK* e *SAMDC*, foram investigados em maior profundidade. Os resultados destas análises constituem o foco principal da presente Dissertação, descritos nos Capítulos 3 e 4.

## **II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1. A seca, a agricultura e a biotecnologia**

As plantas estão continuamente expostas a estímulos ambientais que influenciam seu desenvolvimento, determinando alterações na produtividade das culturas agrícolas. Os estresses abióticos, tais como a seca, a salinidade e as temperaturas extremas são a causa primária de quebras de safra na agricultura mundial, reduzindo a produção das principais plantações em mais de 50% (Boyer, 1982; de Vries, 2000). Uma das principais causas de perdas de produção agrícola mundial é a indisponibilidade de água, que pode ser devida a (i) temperaturas excessivamente altas, que aumentam a evapotranspiração das plantas; (ii) temperaturas excessivamente baixas, pelo congelamento e, conseqüentemente, indisponibilização da água; (iii) salinidade dos solos, que prejudica o equilíbrio osmótico; ou (iv) escassez de água propriamente dita (Bohnert e Jensen, 1996). A seca reduz o crescimento das plantas, afetando diretamente a produtividade ou mesmo, ocasionando suas mortes. Diante da previsão de um aquecimento global para as próximas décadas (IPCC, 2001), os eventos de seca serão, certa e preocupantemente, observados com maior freqüência.

O desenvolvimento de novos genótipos de plantas mais tolerantes a períodos prolongados de déficit hídrico será essencial para que a agricultura continue alimentando e vestindo a crescente população mundial, bem como gerando empregos e movimentando economias locais. O uso de técnicas agronômicas novas e tradicionais em programas de melhoramento visando à redução das perdas na agricultura pela seca deveria ser prioridade entre as estratégias governamentais de países como o Brasil, onde já se enfrentam condições climáticas adversas e severos problemas na irrigação das lavouras. A introdução em plantas de



genes capazes de conferir a tolerância ao estresse hídrico seria benéfica não só em condições ambientais desfavoráveis, mas também em condições ambientais ideais onde a necessidade de irrigação seria menor, reduzindo drasticamente, portanto, os custos de produção e o impacto ambiental causado pelo excessivo consumo de água.

Além das estratégias convencionais, os programas de melhoramento genético deveriam investir na busca de genes capazes de adicionar características de tolerância a estresses ambientais em plantas geneticamente modificadas para que novas cultivares em culturas como a soja, com estreita base genética, também possam ser obtidas. Neste contexto, a biotecnologia e, em especial, a biologia molecular, representa um importante recurso a ser explorado. O conhecimento nessa área ainda é incipiente, mas progressos na elucidação dos mecanismos de tolerância à seca em várias espécies, pelo estudo de genomas funcionais e proteomas, fornecerão informações preciosas para o desenvolvimento de genótipos capazes de tolerar períodos de déficit hídrico sem que a produtividade seja prejudicada substancialmente.

## **2. Respostas metabólicas vegetais ao estresse hídrico**

Durante a evolução das plantas, diferentes adaptações estruturais e funcionais surgiram como estratégias de sobrevivência ao ambiente terrestre, que por vezes impõe às mesmas várias limitações hídricas. A maioria dessas modificações visa à manutenção do crescimento e da reprodução da planta em ambientes limitantes, para que ela possa ser capaz de responder aos múltiplos estímulos bióticos e abióticos a que está exposta. Assim, estabeleceram-se espécies vegetais com maior ou menor grau de tolerância a períodos de déficit hídrico.

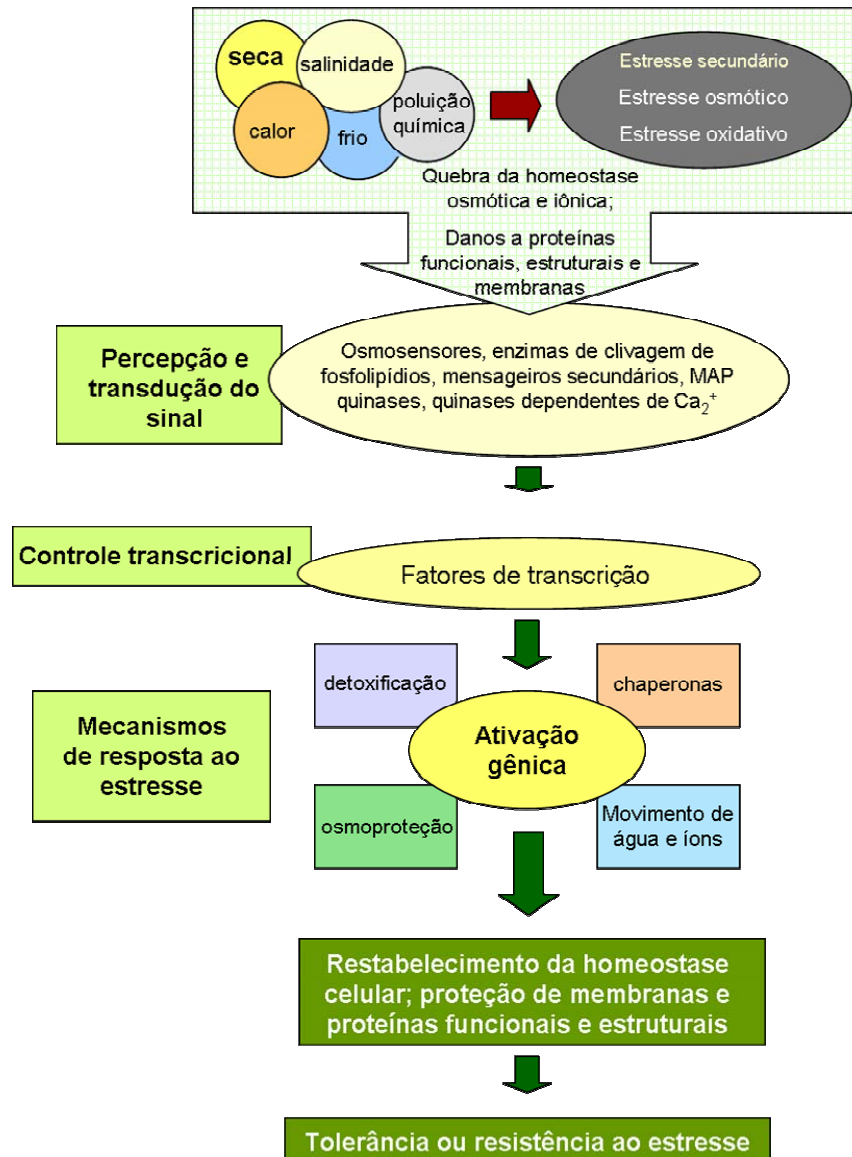
Na agricultura, estresses abióticos como frio, calor, luminosidade, intoxicação por metais, excesso e falta de água, provocam uma série de modificações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares nas plantas, capazes de afetar negativamente seu crescimento e produtividade (Wang *et al.*, 2001). A seca, a salinidade e temperaturas extremas caracterizam estados de deficiência hídrica. Por estarem geralmente inter-relacionados, estes estresses podem levar a danos celulares semelhantes como, por exemplo, estresse oxidativo e perturbação do equilíbrio osmótico e iônico das células (Wang *et al.*, 2003). Conseqüentemente, estas formas de estresse induzem a ativação de genes de vias de sinalização celular (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Zhu, 2001) e de respostas

celulares semelhantes como a produção de proteínas de estresse, a super-expressão de substâncias antioxidantes e o acúmulo de solutos compatíveis capazes de minimizar os danos celulares (Cushman e Bohnert, 2000). Entretanto, alguns genes são especificamente expressos em cada situação de estresse ou na combinação de uma ou mais destas situações (Rizhski *et al.*, 2002, 2004). Essas observações sugerem a existência de várias vias de sinalização celular, desde a percepção do sinal até a expressão gênica nos seus diferentes níveis.

Uma variedade de genes tem sido relacionada à resposta ao estresse hídrico em várias espécies vegetais. Suas funções estão envolvidas não só na proteção das células contra a deficiência de água por meio da produção de proteínas metabólicas importantes, mas, também, por alterações no potencial osmótico celular para aumentar a absorção de água, pelo controle da acumulação de íons, pela metabolização de compostos alterados pelo sinal de estresse e pela regulação da expressão gênica (Bray, 1993, 1997; Nepomuceno *et al.*, 2000). A identificação de genes específicos a cada tipo de resposta ao estresse hídrico tem sido realizada principalmente por análises de transcriptoma em diferentes espécies de plantas submetidas a tratamentos de estresse como calor, frio e seca (Kreps *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2002; Rizhski *et al.*, 2004; Kawaguchi *et al.*, 2004). As análises da expressão de múltiplos genes por microarranjos, especialmente para a planta modelo *Arabidopsis thaliana*, estão em estágio avançado e têm contribuído significativamente para o entendimento dos tipos e da quantidade de genes que são regulados pela deficiência hídrica (Seki *et al.*, 2003, 2004).

Os padrões de regulação da expressão dos genes induzidos pela desidratação são complexos. Alguns genes respondem ao estresse hídrico rapidamente, enquanto outros são lentamente induzidos ou reprimidos. Genes de resposta precoce (*early-response genes*) são induzidos de forma muito rápida (em minutos) e geralmente transiente, enquanto que os genes de resposta retardada (*delayed-response genes*) são ativados mais lentamente (em horas) e apresentam expressão prolongada. A rápida indução é possível porque não requer nova síntese protéica. Esses genes geralmente são fatores de transcrição que, posteriormente, ativam os genes de resposta retardada que, por sua vez, constituem a maioria dos genes responsivos ao estresse. Isto sugere a existência de várias vias de resposta que inicialmente pareciam distintas, mas que se tem revelado uma complexa rede de sinais regulatórios (Cheong *et al.*, 2002; Zhu, 2002).

Em condições naturais, as plantas estão expostas a diversos estresses simultaneamente. A existência de várias vias de resposta deve ampliar a capacidade de adaptação às diferentes combinações de estímulos. Além disto, parece que diferentes mecanismos de proteção agem nos diferentes estádios da perda de água (Hoekstra *et al.*, 2001). Em uma análise comparativa entre três estudos de identificação de genes responsivos à seca por microarranjos em *Arabidopsis*, Bray (2004) salientou que a baixa redundância encontrada de genes com expressão aumentada ou reprimida refletia os efeitos dos métodos de imposição de seca adotados ao invés de um padrão de expressão geral de resposta ao estresse. Percebe-se, então, que as respostas desencadeadas variam de acordo com a origem, a severidade e a duração da ausência de água. No entanto, os efeitos do estímulo nas células são muito semelhantes. Assim, para facilitar o entendimento da complexa rede de respostas celulares à seca, podemos dividi-la em três etapas: (i) a de percepção e transmissão do estímulo agressor; (ii) a de ativação de fatores de transcrição; e por último, (iii) a de ativação dos mecanismos específicos de resposta ao estresse (Figura 1).



**Figura 1:** A complexidade da resposta das plantas aos estresses abióticos. Os estresses primários como seca, salinidade, temperaturas extremas e poluidores químicos estão geralmente interconectados, levando a estresses secundários e a danos celulares semelhantes. Os sinais do estresse desencadeiam os processos de sinalização e de controle da transcrição que, por sua vez, ativam os mecanismos de resposta ao estresse para restabelecer a homeostase e proteger ou reparar proteínas e membranas danificadas. A resposta inadequada em um ou mais passos da sinalização e ativação gênica pode resultar em mudanças irreversíveis da homeostase celular e na destruição de proteínas funcionais e estruturais e de membranas, levando à morte das células. (Adaptado de Wang *et al.*, 2003).

## 2.1 Percepção vegetal do estímulo de estresse hídrico e sinalização

Em situações de déficit hídrico, a percepção do estresse pelas células vegetais representa uma etapa-chave na aquisição de tolerância ao mesmo. O resultado é a ativação de uma cascata de eventos moleculares que é finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento (Bray, 1993). Entretanto, os sensores específicos e as rotas de transmissão dos sinais moleculares de percepção do estresse (*signal-transduction pathways*) em plantas ainda não estão muito bem conhecidos (Kacperska, 2004). Como os modelos propostos para animais, leveduras e bactérias assemelham-se entre si, tem sido sugerindo que, provavelmente, os sistemas vegetais de percepção de estresse também sejam semelhantes aos da maioria dos seres vivos (Urao *et al.*, 1999). Os modelos de percepção do estresse que estão sendo estabelecidos para vegetais superiores mostram que mudanças no volume de células individuais dos órgãos submetidos à desidratação alteram o potencial de pressão (turgor) e o potencial osmótico (concentração) dessas células. Isto provoca alterações na membrana celular e em vários de seus componentes, assim como na concentração celular de metabólitos. As alterações na conformação da membrana celular provocam, ainda, mudanças em canais de transporte ativados por pressão, modificam a conformação ou a justaposição de proteínas sensoriais críticas embebidas nas membranas celulares, e alteram a continuidade entre a parede celular e a membrana celular (Bray, 1997; Hoekstra *et al.*, 2001; Zhu, 2002).

Diferentes osmosensores vêm sendo estudados em plantas e, entre eles, os sistemas de dois-componentes: histidina-cinases como, por exemplo, a ATHK1 de *Arabidopsis* (Urao *et al.*, 1999); a proteína sensora EnvZ e o regulador de resposta OmpR de leveduras (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997); e o osmosensor cinase tipo-receptor (*receptor-like kinases*) NtC7 de tabaco (Tamura *et al.*, 2003). Após a percepção do sinal de estresse hídrico por estes tipos de osmosensores, a transmissão primária do sinal em plantas ocorre por diferentes componentes. Alguns destes sinalizadores primários como íons cálcio, derivados de inositol, ácido fosfatídico (PA) e espécies reativas de oxigênio (EROs) assemelham-se aos mecanismos de sinalização de modelos animais e de microrganismos. Porém outros, como aqueles que envolvem ácido abscísico (ABA), são exclusivos de organismos vegetais.

A concentração citoplasmática de cálcio tem sido apontada como um dos principais mensageiros secundários responsáveis pela iniciação das cascatas de sinalização em plantas e pela regulação da abertura dos estômatos (Chinnusamy *et al.*, 2004). Como afirmado acima, além da concentração de íons cálcio, também têm sido relacionados com funções sinalizadoras de estresse em plantas a fosfolipase C, que atua na produção dos mensageiros secundários inositol di- (IP<sub>2</sub>) e tri-fosfato (IP<sub>3</sub>; Zhu, 2002), relacionados com a liberação de cálcio no citoplasma, o ácido fosfatídico (PA) e EROs (Boudsocq e Laurière, 2005).

O hormônio vegetal ABA também é considerado um importante mensageiro secundário do estresse, relacionado com uma já bem caracterizada via de transdução de sinais. Em condições de desidratação, o ABA é sintetizado *de novo* e se acumula no citoplasma das células. Acredita-se que existam receptores celulares internos e externos para ABA, embora seja desconhecido a quantidade e o tipo de receptor (Bray, 1997; Xiong e Zhu, 2001). Muitos dos genes responsivos à seca estudados até hoje são induzidos por fatores de transcrição que respondem ao acúmulo de ABA, evidenciando o papel vital deste sinalizador (Koornneef *et al.*, 1998; Xiong *et al.*, 2001; Xiong *et al.*, 2002a). As respostas desencadeadas por esta rota são lentas e, provavelmente, relacionadas a medidas de adaptação ao estresse (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

O estado de óxido-redução (redox) de elétrons derivados da fotossíntese, bem como das moléculas carreadoras e aceptoras de elétrons e das moléculas sintetizadas e redox-ativas, tais como EROs, também têm sido apontados como sinalizadores primários de estresses em plantas, já que atuam como agentes reguladores do metabolismo (Foyer e Noctor, 2003). Embora ainda sejam controversos os dados a respeito do papel regulador dessas moléculas (Pfannschmidt, 2003), acredita-se que elas regulem a expressão de vários genes ligados à fotossíntese, como revisado por Chaves e Oliveira (2004). Este processo seria um sistema de retro-alimentação (*feedback*) da fotossíntese em relação ao ambiente, ou seja, serviria para ajustar a produção de energia ao consumo em situações de estresses como a seca.

Após a percepção da perda de água e a transmissão por mensageiros secundários até componentes do núcleo celular, um mecanismo sinalizador deve ser ativado para induzir (ou reprimir) genes específicos de resposta. Devido ao acúmulo citoplasmático de cálcio diante do estresse hídrico, a sinalização via cinases (ou quinases) dependentes de cálcio (CDPK, do

inglês, *calcium-dependent protein kinase*) são candidatas primárias na ativação de respostas. Análises de plantas, leveduras e células animais transgênicas, estudos de expressão de genes responsivos a estresse e a caracterização da ativação de CDPK sugerem que alguns sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  induzidos pelo estresse são percebidos e transmitidos pelas CDPKs (Urao *et al.*, 1994; Sheen, 1996; Saijo *et al.*, 2000). Apesar das CDPKs constituírem uma ampla família de cinases codificadas no genoma de plantas, os genes-alvo específicos para a maioria delas ainda são pouco conhecidos.

Outra importante cascata sinalizadora é a das cinases ativadas por mitógenos (MAPK, do inglês, *mitogen-activated protein kinase*), já bem caracterizada em leveduras (Gustin *et al.*, 1998). Desde então, diversas cinases protéicas têm sido descritas como sendo ativadas por estresse osmótico (Zhu, 2002). Além da sinalização do estresse, as MAPKs também estão envolvidas na sinalização do desenvolvimento, hormonal e de estresses bióticos. Uma das evidências mais fortes da intercomunicação das vias de sinalização durante os diferentes estresses abióticos em plantas vem dos estudos das cascatas de MAPK. O genoma de *Arabidopsis*, por exemplo, codifica aproximadamente 60 MAPKKKs, 10 MAPKKs e 20 MAPKs. Em princípio, os sinais percebidos pelas MAPKKKs precisam ser transmitidos pelas MAPKKs para as MAPKs, o que possibilita essa interconexão dos sinais. Estudos sugerem que as cascatas de MAPKs agem, portanto, como ponto de convergência na sinalização do estresse (Ichimura *et al.*, 1998, 2000; Huang *et al.*, 2000a).

## **2.2 Controle da transcrição de genes vegetais em resposta ao estresse hídrico**

Após a percepção do estresse e transmissão dos sinais, uma série de genes deve ser ativada para proteger as células e combater os efeitos danosos da falta de água. A ativação de uma ou mais rotas de resposta é finamente regulada por uma cascata transcricional. Análises moleculares e genômicas têm demonstrado que vários sistemas regulatórios de transcrição estão envolvidos na indução de genes responsivos a estresse. Diferentes grupos de elementos *cis* presentes em regiões promotoras e fatores *trans* são conhecidos por estarem envolvidos na transcrição desses genes, sendo alguns deles controlados por ABA e, outros, não. Assim, a regulação da resposta ao estresse hídrico ocorre basicamente por intermédio dos sistemas

ABA-dependentes e ABA-independentes (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Zhu, 2002).

Boudsocq e Laurière (2005) sugeriram atualizações às vias de resposta ABA-dependentes descritas anteriormente por Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki (1997), como ilustrado na Figura 2, com uma via de ativação direta da expressão gênica (rota I), e uma via que necessita da biossíntese de fatores protéicos para a expressão dos genes-alvo (rota II). Na primeira via, os genes induzidos contêm, em suas regiões promotoras, os elementos *cis* ABA-responsivos do tipo ABRE (*ABA-responsive elements*), caracterizados pela seqüência consenso PyACGTGGC. Foi demonstrado que fatores de transcrição bZIP<sup>1</sup> do tipo ABF/ABREB (*ABRE-binding factor/ABRE-binding protein*) podem ativar, por exemplo, o promotor do gene responsivo a estresse *rd29A* de *Arabidopsis* pela ligação aos motivos ABRE (Liu *et al.*, 1998; Figura 2, rota I). Este sistema parece funcionar apenas após o acúmulo endógeno de ABA. Além disto, essa ativação é aumentada por modificações pós-transcricionais como fosforilações (Uno *et al.*, 2000). Na segunda via, os genes responsivos a estresses possuem, em suas seqüências promotoras, os elementos MYBR e MYCR, reconhecidos pelas seqüências A/TAACCA e C/TAACG/TG; e CANNTG, respectivamente. Estes elementos *cis* são reconhecidos pelos fatores de transcrição MYB e MYC, os quais são sintetizados somente após a indução por ABA (Figura 2, rota II). Estes fatores estão, portanto, relacionados aos genes de resposta lenta ABA-induzidos (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

Além das duas vias citadas acima, existem ainda outras duas vias de resposta ABA-independentes (Figura 2, rotas III e IV). Por meio de estudos com mutantes de *Arabidopsis* ABA-deficientes (*aba*) ou ABA-insensíveis (*abi*), verificou-se que vários genes de resposta a estresse, como *lti78*, *cor78* e, inclusive, *rd29A*, são diretamente induzidos por seca, frio e salinidade. Embora estes genes respondam à adição de ABA exógeno, eles não necessitam dele para serem ativados (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Bray, 1997; Xiong *et al.*,

---

<sup>1</sup> Fatores de transcrição do tipo bZIP são proteínas diméricas que se caracterizam pela presença de uma região carbóxi- ou amino-terminal rica em aminoácidos básicos, importante para a ativação de outros fatores de transcrição e, mesmo, da RNA-polimerase II, e de uma região rica em leucinas (Leu) e isoleucinas (Ile) a cada sétima posição das  $\alpha$ -hélices, importantes para a dimerização dos fatores e conformação para a ligação ao DNA. Destas características deriva a abreviatura bZIP (Zaha, et al., 2003; Lewin, 2001).

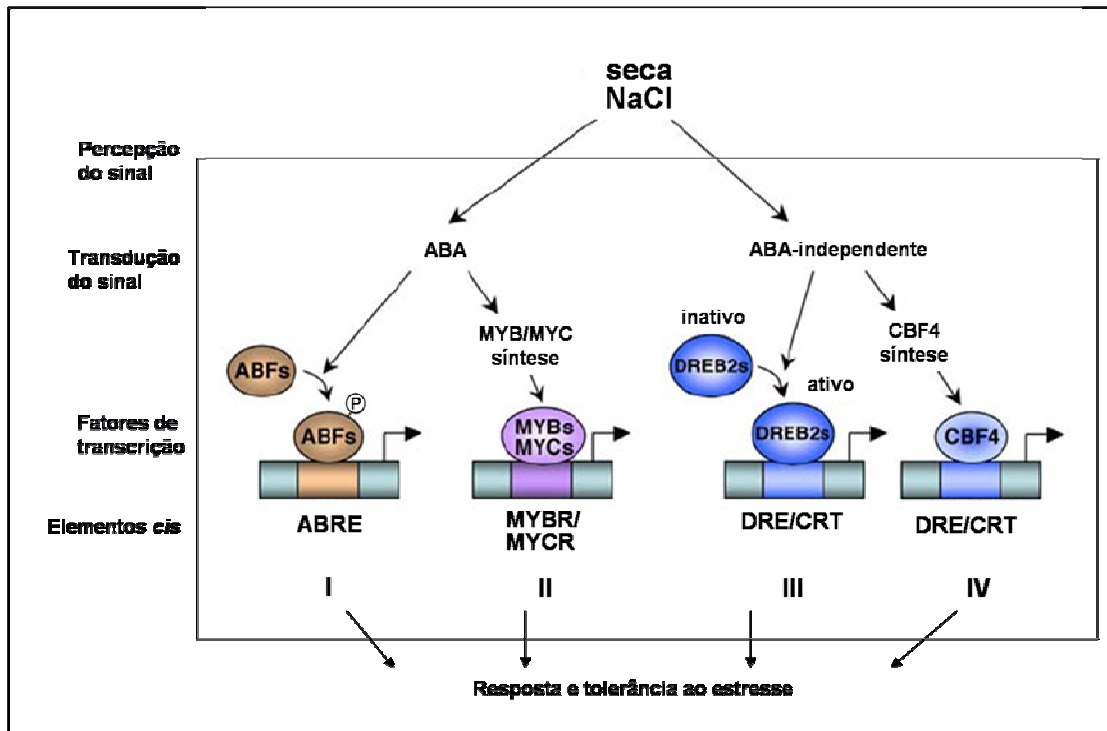


2002b). Isto ocorre porque os promotores destes genes contêm o elemento regulatório *cis* DRE (*dehydration-responsive element*, também conhecido por CRT, de *C-repeat*; Figura 2, rota III), de seqüência-consenso CCGAC, no qual se ligam os fatores de transcrição conhecidos como DREB (*DRE-binding factor*) ou CBF (*C-repeat-binding factor*). Os membros da família DREB1/CBF, como DREB1B, DREB1C e DREB1A (CBF1, CBF2 e CBF3, respectivamente), pertencem à família multigênica AP2/EREBP<sup>2</sup> e são, eles próprios, estresse-induzidos. Para estes fatores, tem sido demonstrado um maior envolvimento em resposta ao frio, enquanto que o fator de transcrição DREB2 é induzido em resposta à seca (Liu *et al.*, 1998). Posteriormente, descobriu-se também uma proteína CBF4, que estaria relacionada à resposta à seca (Haake *et al.*, 2002), constituindo uma segunda rota independente de ABA (rota IV).

Embora essa classificação em rotas distintas sugira independência entre as mesmas, existem indicações da cooperação entre elas. Em ensaios de expressão transiente, proteínas CBF e DREB2 interagiram com ABFs para maior ativação do promotor de rd29A, indicando uma intercomunicação entre as vias ABA-dependente e ABA-independente (Narusaka *et al.*, 2003). Além disto, a super-expressão de fatores tipo-CBFs levaram ao aumento de tolerância ao congelamento mas, também, à seca e à salinidade, reforçando esta interconexão (Kasuga *et al.*, 1999; Haake *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2005).

---

<sup>2</sup> Fatores de transcrição do tipo AP2 são específicos de plantas e foram assim denominados pela presença de domínios de ligação a DNA do tipo AP2. Foram primeiramente caracterizados no fator de transcrição APETALA2, que contém dois desses domínios e está envolvido no desenvolvimento vegetal (Jofuku *et al.*, 1994). A subfamília AP2/EREBP contém apenas um desses domínios de ligação a DNA, e foi primeiramente caracterizada por se ligar ao elemento de promotor GCC de resposta a etileno (Ohme-Takagi e Shinshi, 1995). Esta geralmente está envolvida em resposta a estresses abióticos e bióticos (Gutterson e Reuber, 2004).



**Figura 2:** Regulação da expressão gênica em resposta à seca e à salinidade: vias ABA-dependente (I e II) e ABA-independente (III e IV), com a ligação dos fatores de transcrição aos respectivos elementos *cis*. Alguns fatores, como ABF e DREB2, são diretamente ativados pelo próprio estresse, enquanto outros, como CBF, necessitam ser sintetizados *de novo*. (Adaptado de Boudsocq e Laurière, 2005.)

### 2.3 Respostas adaptativas das plantas ao estresse hídrico

Por meio de uma fina regulação da transcrição gênica, grupos específicos de genes são ativados para acionar os mecanismos específicos de resposta ao estresse hídrico. Acredita-se que muitos dos produtos de genes induzidos pelo déficit hídrico possam proteger as estruturas celulares dos efeitos da perda de água (Nuccio *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003). 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 durante o estresse pode, na verdade, ser resultado de ferimentos ou danos não relacionados ao estímulo que a planta tenha sofrido durante este período, sendo, portanto, uma consequência

indireta. No entanto, alguns desses genes são necessários para a tolerância ao estresse, e a acumulação dos produtos da expressão deles pode se tornar uma resposta adaptativa (Bray, 1993, 1997) assim como a desativação da expressão de um gene pode, também, estar ligada ao aumento da tolerância ao estresse (Nepomuceno *et al.*, 2000).

De forma geral, existem quatro mecanismos básicos de resposta ao estresse hídrico: (i) o responsável pela eliminação de radicais livres formados pelo desequilíbrio fisiológico da célula; (ii) o mecanismo relacionado à proteção de estruturas celulares contra danos provocados pelo estresse; (iii) o mecanismo relacionado à integridade das proteínas celulares; e (iv) o mecanismo responsável pela regulação osmótica da célula (revisado em Ramanjulu e Bartels, 2002; Zhu, 2002; Boudsocq e Laurière, 2005). Estes mecanismos básicos de resposta serão mais bem descritos a seguir.

### **2.3.1 Detoxificação**

Em condições sub-ótimas de funcionamento, ou seja, sob estresse, diferentes rotas metabólicas podem ser afetadas, resultando na desestabilização do equilíbrio redox em várias organelas celulares, como os cloroplastos. Este processo, inevitavelmente, leva à formação de espécies com radicais de oxigênio altamente reativos (EROs), tais como  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^-$ , devido ao aumento do fluxo de elétrons das rotas de redução de oxigênio prejudicando, em especial, o sistema fotossintetizante (Price *et al.*, 1989; Mittler, 2002). Estes compostos oxidantes atacam a maioria das macromoléculas celulares, causando danos ao DNA e afetando a síntese e a estabilidade de proteínas, o que leva a disfunções metabólicas e morte celular.

Para combater o estresse oxidativo, as plantas desenvolveram várias estratégias antioxidantes para eliminar estes compostos tóxicos. Algumas das alternativas conhecidas são as mudanças no fluxo de metabólitos por diferentes vias, a supressão das vias que envolvem a produção de EROs durante o estresse e a indução de vários genes de defesa, como as proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* ou HSPs) e enzimas de detoxificação (*ROS scavengers*; Vierling, 1991; Mittler, 2002). Entre os antioxidantes, incluem-se enzimas como catalases, superóxido-dismutases (SOD), ascorbato-peroxidases (APX), glutationa-S-transferases e glutationa-redutases, assim como moléculas não enzimáticas, tais como ascorbato, glutationa, carotenóides e antocianinas (revisado em Bohnert e Shevelava, 1998;

em Mittler, 2002). Além destes, acredita-se que compostos como osmólitos, proteínas e moléculas anfífilas (por exemplo, peroxirredoxina e tocoferol) possam atuar, também, como antioxidantes (Wang *et al.*, 2003). A interação entre os sinalizadores antioxidantes e seus antioxidantes, especialmente o ácido ascórbico, é apontada por Pignocchi e Foyer (2003) como um fator-chave na regulação do crescimento vegetal e das respostas de defesa aos estresses bióticos e abióticos.

### **2.3.2 Osmoproteção**

Para combater o estresse osmótico, certas plantas, algas marinhas, bactérias e outros organismos acumulam substâncias atóxicas no citoplasma de suas células, os osmoprotetores. Estes são compostos também denominados de solutos compatíveis porque, mesmo em concentrações elevadas, eles não inibem a atividade de enzimas e, tampouco, interferem na estrutura celular (Hoekstra *et al.*, 2001). A função primária dessas substâncias é a de aumentar a pressão osmótica e, desta forma, manter o turgor e a entrada de água nas células, reduzindo a maior perda de água. Alguns estudos têm indicado que estes solutos também poderiam agir como antioxidantes ou, mesmo, chaperonas químicas, pela estabilização direta de membranas e/ou proteínas (Shen *et al.*, 1997; Smirnov, 1998; Wang *et al.*, 2003). Como as membranas apresentam um papel central em várias funções celulares, é crucial para a sobrevivência da planta o impedimento de danos ou o reparo dos mesmos nestas estruturas. Neste sentido, os osmoprotetores são fundamentais, pois agem mantendo a integridade das membranas durante a desidratação e re-hidratação.

Os solutos compatíveis, ou osmólitos, podem ser separados em três grandes grupos: aminoácidos, aminas quaternárias e polióis/açúcares. Entre os aminoácidos mais estudados com estas propriedades está a prolina, sintetizada a partir do glutamato via ácido glutâmico- $\gamma$ -semialdeído (GSA) e  $\Delta$ 1-pirrolina-5-carboxilato (P5C). A P5C-sintase (P5CS), uma das enzimas-chave neste processo de biossíntese, catalisa a conversão de glutamato para P5C que, em seguida, é reduzido pela P5C-redutase (P5CR) em prolina. Na reação reversa, como um sistema de retro-alimentação, a prolina é convertida em glutamato via P5C e GSA com o auxílio da prolina-desidrogenase (ProDH) e da P5C-desidrogenase (P5CDH; Kavi Kishor *et al.*, 1995; Hur *et al.*, 2004).

Compostos de amônia quaternária e compostos funcionalmente similares, os sulfônicos terciários, contêm átomos de nitrogênio ou enxofre completamente metilados, respectivamente, criando uma carga positiva permanente nas porções de N e S (Yeo, 1998). Um representante deste grupo é a glicina-betaína, um osmólito que age diretamente na estabilização de proteínas e de complexos protéicos relacionados ao sistema fotossintetizante. Devido às suas propriedades, a glicina-betaína constitui um verdadeiro osmoprotetor. Sua via biossintética ocorre nos cloroplastos e é curta: colina-monooxigenase (CMO) converte colina em aldeído-betaína que, por sua vez, é convertido pela aldeído-betaína-desidrogenase (BAHD) em glicina-betaína (Burnet *et al.*, 1995). Algumas plantas economicamente importantes, como arroz, soja e batata, não são capazes de acumular quantidades significativas desta substância. Outros compostos osmoprotetores deste grupo são a prolina-betaína, a  $\beta$ -alanina-betaína, a colina *O*-sulfato e o composto sulfônico terciário dimetilsulfopropionato (Rhodes e Hanson, 1993).

Em algumas plantas, a síntese de polióis é desencadeada em resposta ao estresse osmótico, levando a um significativo acúmulo celular de diferentes substâncias como trealose, glicerol, manitol, sorbitol, D-onitol, pinitol e sacarose. Estes compostos são derivados de açúcar-fosfatos por redução e defosforilação (Nuccio *et al.*, 1999). O manitol, por exemplo, é sintetizado a partir de frutose-6-fosfato pela ação da manitol-1-P-desidrogenase NADPH-dependente. A trealose, considerada um dos mais efetivos osmoprotetores em termos de concentração mínima requerida, é sintetizada a partir de glicose-6-fosfato e uridina-difosfoglicose (UDPG) pela enzima trealose-6-P-sintase, que converte estes substratos em trealose-6-fosfato. Este produto é, depois, convertido em trealose pela trealose-6-P-fosfatase (Nuccio *et al.*, 1999).

Uma das principais funções apontadas para os açúcares durante déficit hídrico moderado é o ajuste osmótico promovido pela diminuição do potencial hídrico. Exemplos disto estão em plantas de ressurreição (do inglês, *resurrection plants*) como *Craterostigma plantagineum* e plantas sensíveis à seca, como espinafre (*Spinacea oleracea*), que aumentam a síntese de sacarose durante o déficit hídrico (Ingram e Bartels, 1996). Diante de quadros de seca mais severos, os açúcares podem substituir a água associada a macromoléculas das membranas mantendo sua integridade estrutural (Chaves e Oliveira, 2004). Outra interessante forma dos

açúcares protegerem as células durante a desidratação é pela formação de estruturas vítreas. Ao invés da cristalização de solutos, a presença de açúcares produz um líquido supersaturado, com propriedades mecânicas de um sólido (Koster, 1991; Hoekstra *et al.*, 2001). Este tipo de estrutura tem sido associado com a manutenção da viabilidade de sementes de milho (Williams e Leopold, 1989). Entretanto, um estudo mais recente em leveduras concluiu que alguns polióis devem exercer dupla função na proteção contra o estresse, facilitando o ajuste osmótico mas, também, auxiliando no controle do redox celular, o que poderia explicar seu efeito protetor observado mesmo sob concentrações osmóticas insignificantes (Shen *et al.*, 1999).

Outro grupo de moléculas relacionadas ao estresse hídrico é o das poliaminas, que são polications de baixa massa molecular. Em plantas, elas estão envolvidas em uma série de processos biológicos tais como crescimento, desenvolvimento e resposta a estresses abióticos (Evans e Malmberg, 1989; Kumar *et al.*, 1996; Watson *et al.*, 1998). Devido à sua natureza policationica em pH fisiológico, elas são capazes de se ligar a várias moléculas negativamente carregadas tais como DNA, proteínas livres, proteínas e fosfolípidios de membranas e polissacarídeos pécticos. Também foi demonstrado o seu envolvimento na fosforilação de proteínas, em modificações pós-transcricionais e na transição conformacional do DNA (revisado em Martin-Tanguy, 2001). As principais formas de poliaminas acumuladas em vegetais são putrescina, espermidina e espermina. A putrescina pode ser produzida diretamente a partir de ornitina, via ornitina-descarboxilase (ODC), ou indiretamente, a partir de arginina pela arginina-descarboxilase (ADC). A putrescina é, então, convertida em espermidina e espermina pela adição de grupos poliamino da S-adenosilmetionina descarboxilada (dcSAM). Esta é produzida a partir de S-adenosilmetionina (SAM) pela ação da S-adenosilmetionina-descarboxilase (SAMDC; Walden *et al.*, 1997; Martin-Tanguy, 2001). Em um estudo de análise de expressão gênica diferencial em arroz, foi demonstrado que a SAMDC, uma enzima-chave e, possivelmente, limitante da via biossintetizante, é regulada por vários estresses, incluindo tratamentos de seca e ABA (Li e Chen, 2000).

### 2.3.3 Chaperonas

Além dos osmoprotetores acima citados, uma outra classe de moléculas, as chaperonas, também tem importante papel na proteção de estruturas celulares durante o estresse. Essas podem ser chaperonas de baixo peso molecular ou proteínas do tipo LEA (do inglês, *late embryogenesis abundant proteins*) e desidrinas (do inglês, *dehydrins*).

Proteínas do tipo HSP foram identificadas pela primeira vez em respostas ao estresse de calor. Desde então, a expressão de diversas classes de HSP tem sido descrita em eucariotos, inclusive em plantas, em condições de estresse hídrico, salino, oxidativo e de baixa temperatura (Härndahl *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003). Altamente conservadas, essas proteínas são designadas pelas suas massas moleculares aproximadas em kDa, divididas em cinco famílias: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e HSPs (*small heat-shock proteins*), que variam entre 12 a 40 kDa (Vierling, 1991). Elas participam de vários processos celulares como síntese, transporte, maturação e degradação de proteínas em diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento. A maior parte delas provavelmente funciona como chaperonas, atuando, principalmente, na manutenção do correto dobramento de substratos desnaturados para a posterior renaturação pela rede de chaperonas, e na prevenção da desnaturação de outras proteínas, minimizando a agregação de proteínas não-nativas e removendo estas da célula (Vierling, 1991; Feder e Hofmann, 1999; Wang *et al.*, 2003). Apesar de algumas HSPs serem normalmente produzidas pela célula, acredita-se que elas desempenham importante papel na tolerância ao estresse osmótico, uma vez que há um aumento na produção destas proteínas durante situações de estresse. Trabalhos com plantas transgênicas silenciadas ou super-expressando uma ou mais HSP, corroboram para esta afirmação (Malik *et al.*, 1999; Härndahl *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2001). Como o estresse promove a desnaturação e a agregação de proteínas, uma maior síntese de HSPs ajudaria na proteção das proteínas tanto durante o estresse osmótico como na reidratação (Zhu *et al.*, 1997).

As LEAs foram identificadas, pela primeira vez, como proteínas codificadas por genes expressos durante as fases de maturação e dessecação de sementes (Bray, 1993; Zhu *et al.*, 1997). Atualmente, muitas proteínas do tipo LEA têm sido encontradas em um amplo número de espécies vegetais em resposta à falta de água promovida pela dissecação propriamente dita, pelo frio e por outras formas de estresse osmótico. Elas podem ser categorizadas em, no

mínimo, seis subgrupos, baseados na seqüência de aminoácidos e na sua cinética da expressão (Dure, 1993; Ingram e Bartels, 1996). Apesar da sua função de proteção das estruturas celulares, possivelmente, esse grupo diverso de proteínas serve a mais de uma simples função (Zhu *et al.*, 1997). Devido à sua natureza extremamente hidrofílica, as prováveis funções das proteínas LEA são, além da manutenção da estabilidade de macromoléculas e membranas (chaperonas), o seqüestro de íons e a ligação a moléculas de água (Dure, 1993; Ingram e Bartels, 1996; Bray, 1997; Cushman e Bohnert, 2000). Dentre as diferentes LEAs, duas classes estão diretamente relacionadas com respostas a estresses, sendo a HVA1 um exemplo de uma LEA responsiva ao estresse hídrico (Xu *et al.*, 1996). Outra proteína LEA, do grupo 2, denominada desidrina, RAB, ou D-11, também foi identificada em resposta a diferentes estresses como desidratação ou frio (Close, 1997), assim como durante a maturação de sementes (Bray, 1997). Acredita-se que as desidrinas, assim como outras chaperonas, atuem na proteção de proteínas contra agentes desnaturantes pelo seqüestro de íons e reposição de pontes de hidrogênio, ajudando, assim, na estabilização de membranas (Chaves e Oliveira, 2004). Também tem sido considerado o papel de surfatantes a estas proteínas, prevenindo a coagulação de várias macromoléculas (Close, 1997).

Entretanto, a super-expressão de proteínas LEA nem sempre é suficiente para conferir a tolerância à seca em plantas (Iturriaga *et al.*, 1992). Quando, porém, vários genes que codificam de LEAs (genes *COR*, *rd29A*, *kin1*, *cor6.6/kin2*, *cor15a*, *cor47/rd17* e *erd10*) são simultaneamente ativados por um fator de transcrição (CBF1 ou *DREB1A*) e expressados (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998; Kasuga *et al.*, 1999), as plantas adquiriam tolerância, sugerindo que LEAs devam funcionar sinergisticamente com outros membros.

#### **2.3.4 Osmorregulação**

Uma das mais bem documentadas respostas fisiológicas/moleculares ao déficit hídrico em plantas é a habilidade de algumas espécies ajustarem osmoticamente suas células. Durante a seca, plantas superiores ativamente acumulam açúcares, ácidos orgânicos e íons no citosol para diminuir o potencial osmótico e, conseqüentemente, manter o potencial hídrico e o turgor de suas células próximo do nível ótimo (Bray, 1993, 1997). Quando o turgor é mantido, processos como condutância estomática, taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> e expansão dos tecidos



são total ou parcialmente mantidos (Nepomuceno *et al.*, 1998). Mudanças no potencial osmótico causadas pela concentração de solutos, resultante da perda de água e aquelas causadas pela acumulação ativa de solutos são distintas. Na ausência de acumulação de solutos, o potencial osmótico é inversamente relacionado com o volume osmótico. Reduções no potencial osmótico ocorrem pelo aumento na concentração de solutos presentes na célula túrgida. O ajuste osmótico, portanto, ocorrerá somente se houver a acumulação ativa de solutos, propiciando, em várias espécies, o aumento na capacidade de tolerar períodos curtos de seca (Guo e Oosterhuis, 1997). Desta forma, observa-se que algumas espécies vegetais com alta capacidade de ajuste osmótico, em geral, toleram melhor a seca, o que tem sido relacionado com a diminuição do potencial osmótico e com a retenção de água (Jamaux *et al.*, 1997). Entretanto, a geração de moléculas capazes de capturar e inativar radicais livres pode, também, ser uma das causas da redução do potencial. Assim, a real função do ajuste osmótico poderia estar potencialmente ligada à eliminação de radicais livres, mas, também, gerando como função adicional, a retenção de água (Hare e Cress, 1997; Hoekstra *et al.*, 2001).

Para a manutenção das funções celulares sob estresse, a homeostase iônica também deve ser restaurada. Como altas concentrações de íons, como  $\text{Na}^+$ , inibem muitas enzimas, é necessário evitar seu acúmulo citoplasmático ou no interior de outras organelas que não os vacúolos. Além disto, esta compartimentalização dos íons nos vacúolos também auxilia na restauração da homeostase osmótica (Zhu, 2001). A regulação do potencial osmótico e a compartimentalização de íons ocorre às custas do gradiente eletroquímico de  $\text{H}^+$  e do controle integrado de diferentes ATPases e de outros transportadores associados com membranas celulares (Bray, 1993). Alguns destes transportadores são proteínas de estrutura semelhante à tubular, que atravessam as membranas celulares. Membros dessa família de proteínas, também chamadas de aquaporinas, formam importantes canais água-específicos para íons ou solutos (Bray, 1993, 1997), como observado com a proteína  $\gamma$ -TIP (do inglês, *tonoplast intrinsic protein*), que forma canais água-específicos quando expressa em células modelo de oócitos de *Xenopus*. Durante o estresse, à medida que as proteínas-canal acumulam-se no tonoplasto (membrana do vacúolo), o movimento da água e dos solutos do vacúolo para o citoplasma é promovido, alterando tanto o teor de água quanto o potencial osmótico do citoplasma (Maurel *et al.*, 1993). Yamada *et al.* (1995) identificaram transcritos (mRNA) para proteínas do tipo

MIP (do inglês, *major intrinsic proteins*), cuja abundância muda sob estresse de salinidade em plantas de gelo (*Mesembryanthemum crystallinum*), que são adaptadas ao crescimento sob altos níveis de sódio, seca intensa e baixas temperaturas. Essas MIPs demonstram homologia com aquaporinas de plantas que foram encontradas, principalmente, em células envolvidas no fluxo hídrico, tais como as da epiderme da raiz, as de pontas de raiz, e as de áreas circundantes às células do xilema em raízes (Bohnert *et al.*, 1995). Canais de água facilitam o fluxo hídrico ao longo do gradiente osmótico existente, aumentando, assim, a retenção de água em locais de alta densidade de agentes osmóticos.

### **3. Melhoramento de plantas para a tolerância à seca**

Entre as ferramentas hoje disponíveis para a obtenção de cultivares tolerantes à seca encontra-se a transgênese vegetal. Diferente do melhoramento convencional e de programas de seleção assistido por marcadores, a introdução de genes é uma técnica promissora e mais precisa, constituindo uma poderosa ferramenta à disposição dos melhoristas para a introdução de caracteres de interesse em plantas.

As estratégias tradicionais de melhoramento utilizam a variabilidade genética de germoplasmas vegetais por meio de hibridações interespecíficas ou intergenéricas, por mutações induzidas ou variação somaclonal de células e tecidos. Esses métodos têm permitido a obtenção de sucesso pouco expressivo em relação à tolerância a estresses abióticos, devido à complexidade dos genótipos relacionados à tolerância a estresses abióticos e à dificuldade no estabelecimento de critérios de seleção apropriados para isso (Flowers e Yeo, 1995; Bruce *et al.*, 2002). Do ponto de vista prático, é muito difícil a imposição de estresse de seca em nível de campo, de forma controlada e reproduzível, às grandes populações de plantas normalmente usadas em programas de melhoramento. Monitoramentos abrangentes do crescimento e de parâmetros fisiológicos raramente têm sido usados para selecionar plantas mais produtivas em ambientes com déficit hídrico (Basnayake *et al.*, 1995). Além disto, depois de identificados os loci de características quantitativas (QTLs, do inglês, *quantitative trait loci*) desejáveis, a seleção destes pode exigir muitos cruzamentos para restaurar os traços de interesse como o rendimento de grãos ou a produção de biomassa na época da colheita, junto com os traços de tolerância introduzidos (Cushman e Bohnert, 2000).

Na última década, a maioria dos trabalhos de engenharia genética, que obtiveram sucesso para uso na agricultura, estava direcionada para a resistência a estresses bióticos ou para propriedades tecnológicas (Sonnenwald, 2003). A grande maioria dos estudos relacionados com a tolerância a estresses abióticos, mais especificamente com a seca, ainda está restrita à fase laboratorial. Entretanto, os recentes avanços nessa área sugerem que um rápido progresso será possível em um futuro próximo, alcançando amplo impacto econômico na agricultura mundial. Acredita-se que mesmo pequenas melhoras na tolerância à seca ou no uso mais eficiente da água em plantas economicamente importantes, resultariam em considerável impacto econômico (Chaves e Oliveira, 2004).

Considerando que uma ampla e importante estratégia adaptativa das plantas ao estresse é a contenção do crescimento, um dos maiores desafios da biotecnologia é o desenvolvimento de plantas que sejam, simultaneamente, capazes de tolerar condições adversas e de manter uma produção razoável de biomassa sob estresse (Mitra, 2001). O balanço ótimo entre a conservação de água e a absorção de carbono pode não ser alcançado pela variação de uma única resposta mas, possivelmente, pela combinação de diversas respostas diferentes a um nível que equivale à severidade e à duração do déficit hídrico. Assim, um enfoque reducionista terá sucesso limitado no desenvolvimento de variedades tolerantes à seca. A maior limitação deste tipo de melhoramento genético ainda é o conhecimento insuficiente sobre as bases fisiológicas, moleculares e genéticas das respostas das plantas ao déficit hídrico. Portanto, trabalhos como os descritos anteriormente, que visam a caracterização de genes, genótipos e respostas fisiológicas específicas relacionadas com a seca, são de extrema importância.

Para a conferência da tolerância à seca, as atuais estratégias da engenharia genética consistem na transferência de um ou mais genes envolvidos em alguma das etapas de respostas metabólicas ao estresse, desde a percepção até as respostas mais específicas. Os principais resultados obtidos pela expressão transgênica de diferentes genes em relação à tolerância à seca, apresentados nos tópicos a seguir, encontram-se resumidos na Tabela 1.

### **3.1 Alterações na percepção, sinalização do estímulo e no controle transcricional**

Visando a produção de plantas mais tolerantes a múltiplos estresses abióticos, muitos trabalhos de transgenia têm sido focados na expressão constitutiva ou estresse-induzida de

fatores de transcrição ou de elementos envolvidos nas vias de sinalização celular (Tabela 1.1 e 1.2). A super-expressão de fatores de transcrição representa uma estratégia promissora por permitir a ativação simultânea de vários genes de resposta ao estresse a partir da transferência de apenas um gene, como demonstrado por Jaglo-Ottosen *et al.* (1998) e Kasuga *et al.* (1999) para plantas de *Arabidopsis*. No entanto, as primeiras tentativas que resultaram em evidente sucesso na aquisição de tolerância à seca, falharam em desenvolver plantas morfologicamente normais devido à expressão constitutiva dos transgenes. Quando Liu *et al.* (1998) super-expressaram o gene codificador do fator de transcrição DREB1A sob a regulação do forte promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) em *Arabidopsis*, eles observaram uma maior tolerância à desidratação do que plantas não-transformadas, mas as plantas apresentaram anormalidades no seu crescimento na ausência do estresse. Da mesma forma, tomates transgênicos super-expressando CBF1 constitutivamente também demonstraram resistência ao estresse hídrico, embora algumas plantas apresentassem o fenótipo anão na ausência de estresse (Hsieh *et al.*, 2002a)

Essa dificuldade incentivou a busca por promotores tecido-específicos ou mesmo induzíveis pelo estresse (Tabela 1). Kasuga *et al.* (1999) compararam a expressão constitutiva de DREB1A em plantas com a expressão dirigida pelo promotor do gene *rd29A* (induzido por estresse), e concluíram que esta última estratégia permitia minimizar os efeitos negativos no crescimento das plantas, não alterando, porém, a tolerância à desidratação e outros fatores. Recentemente, Kasuga *et al.* (2004) super-expressaram em plantas transgênicas de tabaco o gene *DREB1A* sob o controle do promotor estresse-induzido derivado do gene *rd29A*, e confirmaram seus resultados anteriores, com plantas mais tolerantes à seca e ao frio e com crescimento normal. Da mesma forma, Pellegrineschi *et al.* (2004) alcançaram bons resultados super-expressando em trigo o gene para DREB1A de *Arabidopsis* com o promotor de *rd29A*, indicando que a combinação deste fator de transcrição com um promotor induzível pode ser de grande utilidade para o melhoramento de várias espécies de plantas transgênicas mais tolerantes a estresses ambientais. Além deste fator de transcrição, alguns outros também vêm sendo testados com conclusões semelhantes (Haake *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2002; Abe *et al.*, 2003; Mattana *et al.*, 2005; Fujita *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005a).

As vias sinalizadoras vegetais ao déficit hídrico também representam um excelente alvo para a tentativa de ativação global de respostas celulares ao estresse. Saijo *et al.* (2000) investigaram a função de OsCDPK7, uma cinase dependente de cálcio, e observaram que a super-expressão em plantas de arroz conferia a tolerância à seca e à salinidade, provavelmente pela indução do acúmulo de proteínas do tipo LEA sem, no entanto, afetar o desenvolvimento e a fertilidade das plantas. Em um outro estudo, agora em milho, sobre a expressão da proteína-cinase 1 (NPK1), uma proteína do tipo MAPKKK de tabaco sob o controle de um promotor constitutivo, Shou *et al.* (2004) verificaram um aumento na tolerância à seca. Estas plantas de milho produziram grãos com qualidade e quantidade similar àqueles produzidos em condições de boa irrigação. Os autores concluíram que a proteína induz um mecanismo de proteção da maquinaria fotossintética da planta contra os danos da desidratação. Outro exemplo é a super-expressão de uma OsMAPK5 (MAPK5 de *Oryza sativa*) em arroz, que resultou em maior tolerância a estresses de seca, sal e frio, enquanto que a sua supressão, por RNA de interferência (RNAi), levou à resistência a estresses bióticos (Xiong e Yang, 2003).

Uma outra estratégia para conferir tolerância ao estresse hídrico foi testada por Qin e Zeevaart (2002). Eles geraram plantas transgênicas de tabaco capazes de super-expressar constitutivamente, ou por indução, o gene *PvNCED1*, que codifica uma enzima de clivagem de 9-*cis*-epoxicarotenóides fundamental à síntese de ABA. O ABA, por sua vez, induz vários genes relacionados à resposta a estresses ambientais. Assim, pela manipulação dos níveis endógenos de ABA e de ácido fáséico, plantas mais tolerantes à seca foram obtidas.

A manipulação da via de resposta modulada por ABA representa uma promissora estratégia para geração de plantas tolerantes à seca. Em um recente estudo, conduzido por Wang *et al.* (2005), plantas de canola foram transformadas com o gene *ERA1*, que codifica a subunidade  $\beta$  da farnesiltransferase (AtFTB) de *Arabidopsis*, uma enzima que modula um regulador da sensibilidade a ABA. Os autores, que primeiramente comprovaram o aumento da resposta a ABA em *Arabidopsis* através da repressão das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da enzima, geraram plantas transgênicas com uma construção anti-senso de ERA1 sob controle do promotor de *rd29A*, que é induzido por seca. As linhagens com maior sensibilidade a ABA foram testadas a campo, em condições de limitação hídrica, durante três anos consecutivos. Em comparação à canola não transformada, as plantas apresentaram uma redução significativa

na condutância estomatal e na evapotranspiração sob condições de estresse moderado. Além disso, as plantas transgênicas apresentaram desenvolvimento normal e, apesar da aplicação do estresse durante o crítico período de florescimento, produziram mais grãos do que a planta controle. Na ausência de estresse, a produção foi equivalente à linhagem não transformada. Os autores concluíram que o resultado positivo foi devido à utilização de um promotor induzido pelo estresse, que torna a hipersensibilidade a ABA condicional e reversível em períodos de irrigação satisfatória.

### **3.2 Alterações em genes funcionais e estruturais**

Alguns dos diferentes genes já descritos como responsivos ao estresse hídrico e que estão sendo testados para o melhoramento de plantas mais tolerantes estão envolvidos na codificação de protetores funcionais, como antioxidantes; estruturais, como osmoprotetores e chaperonas; ou ainda na codificação de proteínas relacionadas ao ajuste osmótico das células. Nesse sentido, alguns resultados importantes vêm sendo obtidos (Tabela 1.3, 1.4, 1.5 e 1.6).

A proteção contra o acúmulo excessivo de EROs tem sido alcançada pela super-expressão do gene de uma aldeído-desidrogenase já presente em *Arabidopsis* (Sunkar *et al.*, 2003). As linhagens transgênicas de *Arabidopsis* exibiram maior tolerância quando expostas à desidratação, assim como a outros estresses (sal, metais pesados e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Além disto, as plantas transgênicas apresentaram menor acúmulo de aldeídos tóxicos derivados da peroxidação de lipídios. Estudos anteriores envolvendo a manipulação de antioxidantes, como a manganês-superóxido-dismutase (MnSOD) e a aldose/aldeído-redutase (MsALR), também resultaram em plantas de alfafa e tabaco mais tolerantes e produtivas em condições de escassez de água (McKersie *et al.*, 1996; Oberschall *et al.*, 2000). No entanto, outras condições e tipos de estresse também deveriam ser testados, uma vez que existem indicativos que a manipulação de enzimas de detoxificação poderia aumentar a suscetibilidade a estresses bióticos (Xiong *et al.*, 2002a).

A manipulação de genes para o aumento de osmólitos como manitol, frutanos, trealose, onitol, prolina ou glicina-betaína, entre outros, pode aumentar a resistência à seca, embora as razões para isto ainda não estejam bem entendidas (Ramanjulu e Bartels, 2002). Um exemplo de maior tolerância conferida pela transgenia a plantas é a super-indução do acúmulo de

prolina em tabaco. Estas plantas acumularam maior biomassa nas raízes e apresentaram melhor desenvolvimento das flores em condições de estresse hídrico do que as não transformadas (Kavi Kishor *et al.*, 1995). Da mesma forma, foi observado um aumento de biomassa em plantas de arroz transformadas com o mesmo gene (Zhu *et al.*, 1998).

O acúmulo de açúcares como frutanas, manitol e *D*-ononitol, também foi induzido para aumentar a tolerância ao déficit hídrico em plantas (Pilon-Smits *et al.*, 1995, 1998; Sheveleva *et al.*, 1997; Tabela 1.4). Apesar de interessante, a super-expressão de osmólitos frequentemente levou a alterações indesejáveis ao crescimento vegetal. Sheveleva *et al.* (1998) super-expressaram um cDNA codificador da sorbitol-6-fosfato-desidrogenase (Stpd1) de maçã em tabaco e verificaram um acúmulo variável de sorbitol. Níveis celulares mais elevados desta enzima provocaram severos danos fenotípicos, inclusive infertilidade. Mais recentemente, Abebe *et al.* (2003) desenvolveram plantas de trigo mais tolerantes a estresses hídrico e salino pela expressão ectópica do gene da manitol-1-desidrogenase (*mtlD*) de *E. coli*. Embora as quantidades de manitol acumuladas fossem muito baixas para proporcionar um ajuste osmótico, as plantas apresentaram fenótipos mais tolerantes e desenvolvimento normal. Por outro lado, linhagens com concentrações mais altas apresentaram danos mais severos no seu desenvolvimento, incluindo esterilidade. Trabalhos como estes demonstram a necessidade de avaliações mais criteriosas sobre a utilidade da super-expressão de genes codificadores de enzimas de síntese de osmólitos, já que altas concentrações podem anular os efeitos benéficos da regulação osmótica proporcionada por eles.

A super-expressão de enzimas para a produção de trealose tem resultado em alguns avanços na produção de plantas tolerantes, como o trabalho de Zhang *et al.* (2005b; Tabela 1.4). Apesar disto, na maioria dos trabalhos com plantas expressando trealose-6-fosfato-sintase (TPS) e/ou -fosfatase (TPP) de microrganismos, observou-se alterações no desenvolvimento vegetal (Holmström *et al.*, 1996; Goddijn *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 1997; Pilon-Smits *et al.*, 1998). Por outro lado, a super-expressão constitutiva ou estresse-induzida das duas proteínas fusionadas (TPSP) em arroz, além da facilidade de expressar os dois genes por meio de apenas um evento de transformação, permitiu o desenvolvimento normal das plantas (Garg *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2003). Assim, a manipulação da produção de trealose

em monocotiledôneas pode representar uma interessante estratégia para o desenvolvimento de plantas com maior tolerância à deficiência hídrica.

A glicina-betaína é um dos solutos compatíveis que pode aumentar a tolerância à seca, mas muitas plantas não a produzem naturalmente. A simplicidade da genética e da via biossintetizante deste composto estimulou tentativas de transgenia. Huang *et al.* (2000b), por exemplo, tentaram induzir o acúmulo de betaína em três plantas (*Arabidopsis*, tabaco e canola) que, naturalmente, não produziam este composto. Esta tentativa foi realizada pela introdução de uma enzima da rota de síntese, a colina-oxidase. No entanto, as plantas só foram capazes de acumular este composto com a suplementação exógena de colina, demonstrando a necessidade de se aumentar, primeiro, a produção endógena de colina. Em uma tentativa mais recente, Quan *et al.* (2004) transformaram plantas de uma cultivar elite de milho com uma colina-desidrogenase (*betA*) de *E. coli* e alcançaram bons resultados. Além da aquisição de tolerância à seca, as plantas foram capazes de manter a produtividade sob condições não favoráveis. O milho é um vegetal que naturalmente produz glicina-betaína, mas os níveis endógenos variam entre as diferentes variedades.

Em relação à manipulação da síntese de poliaminas, vários trabalhos enfocaram, principalmente, o potencial destes compostos em conferir a tolerância à salinidade em plantas. Roy e Wu (2001) super-expressaram, em arroz, um *ADC* de aveia sob controle de um promotor induzido por ABA e observaram um aumento na atividade de ADC e acúmulo de poliaminas em plantas submetidas a estresse, o que resultou em um aumento na biomassa das plantas transgênicas em condições de salinidade. Roy e Wu (2002) também transformaram plantas de arroz com o cDNA de uma outra enzima da via biossintética de poliaminas, uma SAMDC de *Tritordeum*, sob controle do mesmo promotor estresse-induzido. As plantas, que apresentaram crescimento normal na ausência de estresse, se desenvolveram melhor sob estresse com NaCl do que plantas não transformadas, acumulando maiores quantidades de espermidina e espermina. Aumento na tolerância à salinidade também foi observado em plantas de tabaco expressando constitutivamente (CaMV35S) um *ODC* de rato (Kumria e Rajam, 2002). Posteriormente, trabalhos explorando a resposta de plantas transgênicas a múltiplos estresses foram realizados. Waie e Rajam (2003) geraram plantas transgênicas de arroz super-expressando um gene de SAMDC humano e observaram, além do aumento na



tolerância à salinidade, uma maior tolerância à seca imposta pelo tratamento com polietilenoglicol (PEG). Plantas transgênicas de *A. thaliana* potencialmente capazes de tolerar múltiplos estresses (frio, congelamento, salinidade, hiperosmose, seca e Paraquat) foram obtidas por Kasukabe *et al.* (2004) pela transferência e expressão do gene da espermidina-sintase (SPDS) de *Cucurbita ficifolia*. Análises da expressão gênica destas plantas revelaram um aumento na transcrição de vários genes, inclusive fatores de transcrição relacionados com a resposta a estresses como DREB, e proteínas de proteção, sugerindo um importante papel da SPDS como regulador das vias de sinalização de estresse. A super-expressão de outras enzimas da biossíntese de poliaminas também demonstrou ser uma estratégia potencial para conferir a tolerância a diferentes estresses abióticos. Capell *et al.* (2004) expressaram constitutivamente, em arroz, um gene de *Datura stramonium*, que codifica a enzima arginina-descarboxilase (ADC), produzindo plantas mais tolerantes à seca. O mesmo grupo produziu também plantas de arroz tolerantes a seca super-expressando uma SAMDC, que estão sendo testadas a campo (Capell, 2004).

Além dos exemplos acima citados, a manipulação de genes codificadores de chaperonas também tem sido alvo de muitos estudos, como a da construção de linhagens transgênicas de trigo expressando o gene *HVA1*, que codifica uma proteína do tipo LEA do grupo 3 de cevada (Sivamani *et al.*, 2000). Embora outros autores tenham comprovado anteriormente a tolerância ao estresse hídrico conferida pelo gene *HVA1* (Tabela 1.5), poucos testaram suas plantas transgênicas em condições mais reais de estresse. Com o objetivo de explicar o mecanismo de tolerância conferido por LEAs, Babu *et al.* (2004) utilizaram uma construção já conhecida (Xu *et al.*, 1996) para gerar plantas transgênicas de arroz que foram submetidas a ciclos prolongados de seca. Os autores comprovaram que a tolerância adquirida não foi devida a ajustes osmóticos mas, sim, à proteção de membranas celulares proporcionada pelas LEAs. Recentemente, Bahieldin *et al.* (2005) submeteram plantas de trigo expressando constitutivamente *HVA1* (produzidas por Sivamani *et al.*, 2000) a condições de estiagem a campo (falta de chuva, com irrigação controladas). Após seis anos de experimentos (seis estações consecutivas), conduzidos em campos nos Estados Unidos e Egito, os autores concluíram que o gene *HVA1* tem, de fato, a capacidade de conferir proteção ao estresse

hídrico em trigo transgênico, mantendo a produtividade esperada. Uma das linhagens testadas já está sendo utilizada em cruzamentos de um programa de melhoramento convencional.

Outras proteínas que também podem ter um papel importante na proteção contra a seca são as HSPs, incluindo as pequenas HSPs (*small* ou smHS) como as da classe At-HSP17.6A. Esta, quando super-expressada em *Arabidopsis*, aumentou a tolerância à seca e à salinidade (Sun *et al.*, 2001). Plantas de tabaco que apresentaram maior tolerância à seca também foram obtidas por Alvim *et al.*, 2001 pela expressão constitutiva da proteína BiP (*binding protein*). Esta proteína, que é induzida em diferentes situações de estresse, é uma chaperona membro da família de HSPs70, está localizada no lúmen do retículo endoplasmático das células (*ER-resident*), onde participa da montagem de outras proteínas. Sob progressiva desidratação, as taxas fotossintéticas foram mantidas nas plantas transgênicas estressadas em valores similares àqueles medidos em plantas selvagens irrigadas.

Por fim, uma outra abordagem que vem sendo testada é a manipulação de elementos ligados à osmoregulação, como as aquaporinas. A relação entre o papel das aquaporinas na regulação do nível de água das plantas e a regulação da expressão do gene da aquaporina ainda não está esclarecida (Aharon *et al.*, 2003). Por exemplo, a super-expressão em tabaco do gene *AthH2*, que codifica a aquaporina PIP1b de *Arabidopsis*, melhorou o crescimento na ausência de estresses, mas não foi efetiva sob seca e salinidade (Aharon *et al.*, 2003). Posteriormente, uma outra aquaporina, NtAQP1 de tabaco, foi super-expressada em tabaco por Uehlein *et al.* (2003) o que levou a um aumento da permeabilidade das membranas a CO<sub>2</sub> e à água, com conseqüente crescimento foliar. Estas características são indicativas de que a planta responde melhor em ambientes com seca, embora elas não tenham sido efetivamente desafiadas com este estresse. De fato, poucos trabalhos na manipulação da osmoregulação comprovaram melhor desempenho de plantas transformadas durante tratamentos de seca (Gaxiola *et al.*, 2001; Laporte *et al.*, 2002).

**Tabela 1:** Resumo do levantamento bibliográfico sobre a geração e análise de plantas transgênicas potencialmente tolerantes ao déficit hídrico.

<b>1.1. Percepção e sinalização do estímulo</b>					
<b>Gene/ Proteína</b>	<b>Seqüência Promotora</b>	<b>Origem do Gene</b>	<b>Planta-alvo</b>	<b>Fenótipos</b>	<b>Referências</b>
<i>OsCDPK7</i>	CaMV 35S	<i>Oryza sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Maior tolerância à seca e à salinidade; indução da expressão da proteína salt e proteínas LEA (rab16A, wsi18)	Saijo <i>et al.</i> , 2000
<i>PvNCED1-</i> (biossíntese de ABA)	CaMV 35S; dexametasona- (DEX- induzível)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	Maior tolerância à seca; menor perda de água em folhas induzidas por DEX	Qin e Zeevaart, 2002
<i>OsMAPK5</i>	CaMV 35S	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	A super-expressão aumentou a atividade cinásica de OsMAPK5 e a tolerância à seca, à salinidade e ao frio; a supressão levou à hipersensibilidade aos estresses citados, mas aumentou a resistência a estresses bióticos	Xiong e Yang, 2003
<i>NPK1 – MAPKKK</i>	CaMV 35S modificado	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Zea mays</i>	Maior tolerância à seca; maiores taxas fotossintéticas; desenvolvimento normal, mas amadurecimento retardado sob estresse	Shou <i>et al.</i> , 2004
<i>ERAI</i> (anti- senso)	CaMV 35S e <i>rd29A</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>A. thaliana</i> ; <i>Brassica napus</i>	Maior sensibilidade a ABA; redução significativa na condutância estomatal e na evapotranspiração; desenvolvimento normal; boa produção de grãos.	Wang <i>et al.</i> , 2005

## 1.2. Controle da transcrição

Gene/ Proteína	Seqüência Promotora	Origem do Gene	Planta-alvo	Fenótipos	Referências
DREB1A e DREB2A	CaMV 35S	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	DREB1A: aumento na expressão de genes-alvo sob estresse e na tolerância à desidratação e ao congelamento; fenótipos anormais; DREB2A: não significante	Liu <i>et al.</i> , 1998
CBF3/ DREB1A	CaMV 35S e <i>rd29A</i> (estresse- induzido)	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Tolerância à seca, à salinidade e ao congelamento; crescimento severamente retardado na ausência de estresse	Kasuga <i>et al.</i> , 1999
CBF1/ DREB1B	CaMV 35S	<i>A. thaliana</i>	<i>L. esculentum</i>	Maior tolerância aos estresses hídrico, oxidativo e ao frio; fenótipo anão, maiores níveis de prolina, fechamento mais rápido dos estômatos; fenótipo anão na ausência de estresse	Hsieh <i>et al.</i> , 2002a e 2002b
CBF4	CaMV 35S	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Expressão constitutiva de genes induzidos por seca e frio (COR78a e COR15a); maior tolerância à seca e ao congelamento; crescimento e florescimento retardados, pecíolos encurtados e folhas verdes mais escuras	Haake <i>et al.</i> , 2002
ABF3; ABF4 – fatores bZIP	CaMV 35S	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Hipersensibilidade ao ABA e leves anomalias morfológicas; redução na taxa de respiração pelo fechamento de células-guarda, e aumento de tolerância à seca	Kang <i>et al.</i> , 2002
AtMYC2 e/ou AtMYB2	CaMV 35S	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Maior tolerância ao estresse osmótico; indução de vários genes responsivos a estresse, inclusive <i>rd22</i> ; hipersensibilidade à ABA; anomalias morfológicas de leves a severas, fenótipo anão	Abe <i>et al.</i> , 2003

DREB1A CBF3/	CaMV 35S e <i>rd29A</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>N. tabacum</i>	Maior tolerância à seca e ao frio; efeitos negativos no crescimento minimizados pela expressão induzida somente na presença do estresse	Kasuga <i>et al.</i> , 2004
DREB1A	<i>rd29A</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Substancial tolerância à seca: plantas transgênicas murcharam 10 dias após as plantas-controle na total falta de água	Pellegrineschi <i>et al.</i> , 2004
CBF3/ DREB1A; ABF3	<i>ubi1</i> (ubiquitina de <i>Z. mays</i> )	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>	Plantas mais tolerantes à seca; crescimento normal; indução de vários genes ativados por estresse	Oh <i>et al.</i> , 2005
<i>Osmyb4</i>	CaMV 35S	<i>O. sativa</i>	<i>A. thaliana</i>	Maior tolerância à seca; acúmulo de solutos compatíveis (glicose, frutose, sacarose, prolina, glicina betaína e sinapoil malato) em grandes quantidades na presença e ausência de estresse; maior expressão de P5CS e menor de P5CDH	Mattanna <i>et al.</i> , 2005
AREB1ΔQ (forma ativada)	CaMV 35S	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Maior tolerância à seca, hipersensibilidade ao ABA, ativação de genes com motivos ABRE nos promotores (ex. LEA)	Fujita <i>et al.</i> , 2005
WXP1 (fator de transcrição putativo de domínio AP2)	CaMV 35S	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Medicago sativa</i>	Aumento na quantidade de cera na cutícula das folhas; indução de genes relacionados à formação de cutícula; crescimento retardado; redução da perda de água foliar; maior tolerância à seca	Zhang <i>et al.</i> , 2005a

1.3. Detoxificação					
Gene/ Proteína	Seqüência Promotora	Origem do Gene	Planta-alvo	Fenótipos	Referências
MnSOD	CaMV 35S	<i>N. plumbaginifolia</i>	alfafa	Melhor rendimento em condições de seca, testadas em campo	McKersie <i>et al.</i> , 1996
<i>MsALR</i> (aldose/ aldeído redutase)	CaMV 35S	alfafa	<i>N. tabacum</i>	Efeito detoxificante (redução de aldeídos reativos derivados da peroxidação lipídica), com aumento de tolerância a múltiplos estresses, inclusive seca prolongada	Oberschall <i>et al.</i> , 2000
<i>Ath-ALDH3</i> (aldeído- desidrogena- se)	Duplo CaMV 35S	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Maior tolerância à desidratação e a outros estresses abióticos; aumento na atividade de Ath-ALDH3 e diminuição no acúmulo de aldeídos reativos derivados da peroxidação de lipídios	Sunkar <i>et al.</i> , 2003

1.4. Osmoproteção					
Gene/ Proteína	Seqüência Promotora	Origem do Gene	Planta-alvo	Fenótipos	Referências
<i>SacB</i>	CaMV 35S	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>N. tabacum</i>	Acúmulo de frutanas; tolerância à seca, com aumento em 33% do peso fresco (em relação às plantas-controle) sob estresse	Pilon-Smits <i>et al.</i> , 1995
P5CS	CaMV 35S	<i>Vigna aconitifolia</i>	<i>N. tabacum</i>	Acúmulo de prolina (2X mais que em plantas-controle), maior tolerância à seca devido à manutenção do potencial osmótico celular; aumento de biomassa de raízes e desenvolvimento de flores sob estresse	Kavi Kishor <i>et al.</i> , 1995
IMT1 (mio- inositol- <i>O</i> - metiltransfe- rase)	CaMV 35S	<i>Mesembryan- themum crystallinum</i>	<i>N. tabacum</i>	Acúmulo de D-onitol; maior tolerância à seca e salinidade; maior proteção da fotossíntese	Sheveleva <i>et al.</i> , 1997

P5CS	AIPC-ABA (estresse-induzido)	<i>V. aconitifolia</i>	<i>O. sativa</i>	Acúmulo de prolina; aumento de biomassa sob estresse hídrico e salino	Zhu <i>et al.</i> , 1998
Trealose-6-P sintase; Trealose-6-P fosfatase	CaMV 35S	<i>B. subtilis</i>	<i>N. tabacum</i>	Maior eficiência fotossintética e maior peso seco sob condições de estresse	Pilon-Smits <i>et al.</i> , 1998
<i>Sac B</i>	CaMV 35S	<i>B. subtilis</i>	<i>Beta vulgaris</i>	Baixos níveis de acúmulo de frutanas ; 2 linhagens tolerantes à seca, apresentando maior peso seco sob estresse; sem diferença de crescimento em condições ótimas	Pilon-Smits <i>et al.</i> , 1999
COX (colina-oxidase)	Duplo CaMV 35S + AMV	<i>Arthrobacter pascens</i>	<i>A.thaliana</i> ; <i>N. tabacum</i> ; <i>B. napus</i>	Maior acúmulo de betaina somente com suplementação exógena de colina: moderada tolerância à seca, à salinidade e ao congelamento	Huang <i>et al.</i> , 2000 (a e b)
Gene fusionado TPSP (trealose-6-P-sintase/ fosfatase)	ABA-induzido ou <i>rbcS</i> (tecido-específico)	<i>Escherichia coli</i>	<i>O. sativa</i>	Crescimento vegetal sustentado; danos foto-oxidativos reduzidos e melhor balanço mineral sob seca e outros estresses abióticos; aumento na atividade fotossintética também na ausência de estresse	Garg <i>et al.</i> , 2002
<i>AtGolS2</i> (galactinol-sintase)	CaMV 35S	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Aumento de galactinol e rafinose endógenos em condições de estresse; diminuição da transpiração foliar; maior tolerância à seca	Taji <i>et al.</i> , 2002
<i>MtID</i> (manitol-1-fosfato-desidrogenase)	<i>ubil</i>	<i>E. coli</i>	<i>T. aestivum</i>	Maior tolerância à seca; acúmulo de manitol em concentrações baixas, insuficientes para ajuste osmótico; plantas com maior acúmulo apresentaram severas anormalidades	Abebe <i>et al.</i> , 2003
Gene fusionado TPSP	<i>ubil</i>	<i>E. coli</i>	<i>O. sativa</i>	Acúmulo de altos níveis de trealose, crescimento sem alterações fenotípicas; aumento na tolerância à seca, a sal e ao frio	Jang <i>et al.</i> , 2003

SAMDC	CaMV 35S	<i>Homo sapiens</i>	<i>N. tabacum</i>	Aumento nos níveis de espermidina e putrescina (formas conjugadas); crescimento inicial lento; tolerância à seca, à salinidade e a estresses bióticos	Waie e Rajam, 2003
ADC (arginina-descarboxilase)	<i>ubil</i>	<i>Datura stramonium</i>	<i>O. sativa</i>	Sob estresse, aumento nos níveis de putrescina, levando à síntese de espermidina e espermina; tolerância à seca	Capell <i>et al.</i> , 2004
SPDS (espermidina-sintase)	CaMV 35S	<i>Cucurbita ficifolia</i>	<i>A. thaliana</i>	Aumento no conteúdo foliar e na atividade de SPDS; maior tolerância à seca e a outros estresse abióticos	Kasukabe <i>et al.</i> , 2004
<i>betA</i> (colina-desidrogenase)	CaMV 35S	<i>E. coli</i>	<i>Z. mays</i> , cultivar-elite	Acúmulo de altos níveis de glicina-betaína; maior tolerância à estresse hídrico e osmótico nos estádios de germinação e plântula; apresentaram maior produção de grãos do que as plantas-controle após estresse de seca	Quan <i>et al.</i> , 2004
Trealose-sintase	Duplo CaMV 35S	<i>Grifola frondosa</i>	<i>N. tabacum</i>	Acúmulo de altos níveis de trealose e aumento na tolerância à seca e à salinidade; desenvolvimento normal	Zhang <i>et al.</i> , 2005b

### 1.5. Chaperonas

Gene/ Proteína	Seqüência Promotora	Origem do Gene	Planta-alvo	Fenótipos	Referências
HVA1 (LEA grupo 3)	<i>act1</i> (actina de <i>O. sativa</i> )	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>O. sativa</i>	Expressão constitutiva de <i>HVA1</i> ; maior tolerância à seca e ao estresse salino	Xu <i>et al.</i> , 1996
HVA1 (LEA grupo 3)	<i>ubil</i>	<i>H. vulgare</i>	<i>T. aestivum</i>	Expressão constitutiva de <i>HVA1</i> ; aumento da produtividade de biomassa e na eficiência de utilização de água sob estresse	Sivamani <i>et al.</i> , 2000
At-HSP17.6A	CaMV 35S	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Aumento na tolerância à seca e à salinidade; aumento no peso seco em relação ao controle, sob estresse	Sun <i>et al.</i> , 2001



BiP (chaperona)	CaMV 35S	<i>Glycine max</i>	<i>N. tabacum</i>	Tolerância ao estresse hídrico com manutenção da turgidez e água das células, aumento na condutância estomatal e na taxa de transpiração sob desidratação progressiva	Alvim <i>et al.</i> , 2001
HVA1 (LEA grupo 3)	<i>act1</i>	<i>H. vulgare</i>	Arroz Basmati (aromático)	Acúmulo de altos níveis de LEA3 nas folhas de linhagens homozigotas; maior tolerância à seca e à salinidade	Rohila <i>et al.</i> , 2002
LLA23 (proteína ASR, tipo LEA)	CaMV 35S	<i>Lilium longiflorum</i>	<i>A. thaliana</i>	Maior tolerância à seca, à salinidade e ao estresse osmótico; em condições de seca, as plantas transgênicas apresentaram menores taxas de perda de água	Yang <i>et al.</i> , 2005

<b>1.6. Osmoregulação</b>					
<b>Gene/ Proteína</b>	<b>Seqüência Promotora</b>	<b>Origem do Gene</b>	<b>Planta-alvo</b>	<b>Fenótipos</b>	<b>Referências</b>
AVP1 (H <sup>+</sup> -pirofosfatase)	Duplo CaMV 35S	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Maior tolerância a NaCl e à seca; maior acúmulo de Na <sup>+</sup> e K <sup>+</sup> nos tecidos foliares, maior retenção de cátions nas vesículas e, conseqüentemente, água nas células	Gaxiola <i>et al.</i> , 2001
enzima málica-NADP	Manopina sintase (modificado, de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> )	<i>Z. mays</i>	<i>N. tabacum</i>	Defesa contra seca por aumento na condutância estomatal e aumento de peso fresco por unidade de água consumida; taxa de crescimento e desenvolvimento semelhantes ao tipo selvagem	Laporte <i>et al.</i> , 2002

## **CAPÍTULO III**

### **Cloning and characterization of *Eucalyptus* cDNAs encoding S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC)**

(Trabalho a ser submetido à revista *GENE – Section Functional Genomics*)

**Cloning and characterization of *Eucalyptus* cDNAs encoding S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC)**

Ana Paula Körbes<sup>1</sup>, Rogério Margis<sup>2</sup>, Maria Helena Bodanese-Zanettini<sup>1</sup>, Giancarlo Pasquali<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>*Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil;* <sup>2</sup>*Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.*

*Abbreviations:* PAs, polyamines; SAMDC, S-adenosylmethionine decarboxylase; EST, expressed sequence tag; ORF, open reading frame; uORF, upstream ORF; qRT-PCR, quantitative reverse transcription PCR.

\* Corresponding author. C.P. 15.005, CEP 91501-970. Tel.: 51 3316 9410. *E-mail address:* pasquali@cbiot.ufrgs.br

## Abstract

S-denosylmethionine decarboxylase (SAMDC) is one of the key regulatory enzymes in the biosynthesis of polyamines. Two full-length (SAMDC) cDNAs, *EgrSAMDC1* and *EgrSAMDC2*, were identified and characterized from a *Eucalyptus grandis* cDNA collection belonging to the GENOLYPTUS transcriptome project. Both cDNAs encoded tiny and small ORFs in addition to the main SAMDC ORFs, which, in turn, presented all conserved domains associated with protein functions. Genomic DNA analysis indicated that *E. grandis* contains two genes encoding SAMDC and we predict that *EgrSAMDC1* and *EgrSAMDC2* are the two sequence versions of such genes. RNA gel blot analysis showed that the highest levels of *EgrSAMDCs* expression were present in flowers, while more moderate levels were observed in stems and leaves. General analysis of the effect of various environmental stresses and plant growth regulators on the expression of *EgrSAMDCs* suggested little variation in SAMDC steady-state mRNA levels. *EgrSAMDC2* was positively induced by ABA and high salinity, and drastically reduced after UV and drought treatments of *E. grandis* seedlings. These results suggest that the *EgrSAMDC2* gene might be more related to plant response against high salinity, possibly via ABA signaling, than to other environmental or biotic-like stress responses.

*Keywords:* *Eucalyptus grandis*, polyamine synthesis, constitutive expression, stress tolerance, gene expression, gene copy number

## 1. Introduction

Polyamines (PAs), such as putrescine, spermidine and spermine, are a group of small positively charged molecules, which have been implicated in various plant growth and developmental processes. These include stimulation of cell division, regulation of rhizogenesis, embryogenesis, senescence, floral and fruit development, as well as the elicitation of resistance or tolerance responses to some biotic and abiotic environmental stresses (see reviews, Evans and Malmberg 1989; Bouchereau et al., 1999; Kakkar and Sawhney, 2002). It has been suggested that PAs regulate chromatin organization, transcription and translation (Cohen, 1998). Because of their polycationic nature at a physiological pH, PAs can bind strongly to negatively-charged cellular components such as nucleic acids, proteins and phospholipids, and may help to maintain the integrity of membranes and nucleic acids of cells submitted to different stress conditions (Martin-Tanguy, 2001).

The PA biosynthetic pathway is ubiquitous in living organisms and has been well-characterized. It is a relatively short route in terms of the number of enzymes involved (Tiburcio et al., 1997). In plants, putrescine is either synthesized from ornithine via ornithine decarboxylase (ODC) or from arginine via arginine decarboxylase (ADC). S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC), a pyruvoyl-dependent enzyme, produces, from S-adenosylmethionine (SAM), the aminopropyl moiety for spermidine and spermine biosynthesis. SAMDC is probably the rate-limiting enzyme in PA biosynthetic pathways since the level of decarboxylated SAM (dSAM) in living organisms is very low and SAMDC has a relatively short half-life of about 1–2 h (Cohen, 1998; Konstantinos et al., 2005).

Plant SAMDC is initially synthesized as an inactive proenzyme and is autocatalytically processed to produce the mature form of the enzyme. This process is very rapid and does not require putrescine for an optimal rate of processing and activity. This is different from mammalian and yeast SAMDCs, whose proenzyme processing is catalyzed by putrescine (Xiong et al., 1997). Mammalian SAMDC activity is negatively regulated in response to increasing PA levels by means of a translational mechanism involving a small upstream open reading frame (uORF) in the 5' leader sequence of the mRNA (Ruan et al., 1996; Mize et al., 1998). The characterization of several plant genes revealed that it is a common *SAMDC*

feature the presence of a long transcript leader sequence that carries uORFs (Franceschetti et al., 2001), which, unlike the short mammalian SAMDC uORF, is also related to the regulation of gene expression (Hu et al., 2005a).

The protective property of PAs in plants has been studied under different stress conditions (for review, Bouchereau et al., 1999). Most interestingly, overexpression of *ADC*, *ODC* and *SAMDC* genes in a variety of transgenic plants under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter or an ABA-inducible promoter indicated that these genes may enhance tolerance to abiotic stresses including ozone, salt and drought (Roy and Wu, 2002; Capell et al., 2004), as well as resistance to biotic stresses such as fungal wilts (Waie and Rajam, 2003). Due to such important role in plant stress responses and development, there has been growing research interest in the function of *SAMDC* genes in many species. Up to now, several genes encoding SAMDC have been cloned and characterized from a variety of organisms including human (Pajunen et al., 1988), yeast (Kashiwagi et al., 1990) and plant species such as potato (Mad Arif et al., 1994), spinach (Bolle et al., 1995); carnation (Lee et al., 1997a), *Arabidopsis thaliana* (Franceschetti et al., 2001); pea (Marco and Carrasco, 2002), soybean (Tian et al., 2004) and rice (Li and Chen, 2000; Pillai and Akiyama, 2004). However, among tree species, only two apple full-length cDNAs (Hao et al., 2005) were cloned and characterized. Two other *SAMDCs* sequences, from peach (AJ704800 – partial; Ziosi et al., 2003) and grapevine (AJ567368), were submitted to the GenBank but were not extensively characterized.

In order to contribute to the knowledge of *SAMDC* genes in trees, we present here the structure of two full-length *Eucalyptus grandis* *SAMDC* cDNAs, *EgrSAMDC1* and *EgrSAMDC2*. We have also characterized the genomic organization of the *SAMDC* genes and the expression pattern of *EgrSAMDC2* in different *E. grandis* organs and in seedlings challenged by different treatments.

## **2. Material and Methods**

### *2.1 cDNA Library construction and sequencing*

Seeds of *E. grandis* (supplied by Aracruz Cellulose S.A., Guaíba, RS, Brazil) were surface sterilized by sequentially soaking in 70% ethanol for 2 min, 1% (v/v) active chlorine solution for 15 min and five times in sterilized water. Seeds were then placed in culture flasks (5 cm in diameter, 8 cm high) containing the Murashige & Skoog (MS, Invitrogen) complete medium solidified by 0.7% (w/v) Phytoagar (Duchefa) and left to germinate in the dark for two days at 26 $\pm$ 2 °C. After germination, flasks were transferred to a culture room with a 16 h photoperiod at the same temperature. Total RNA was extracted from 60-days old *E. grandis* seedlings using Concert Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions for multi RNA minipreps. Messenger RNA was extracted by the employment of the Oligotex mRNA Purification System (Qiagen). A total amount of 5  $\mu$ g mRNA was finally used for cDNA library construction by the Superscript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning Kit (Invitrogen).

Plasmid DNA preparation was carried out in 96-well microplates using standard methods based on alkaline lysis and filtration in Millipore filter plates. Plasmid samples were sequenced using the automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armed with 50 cm capillaries and POP6 polymer (Applied Biosystems). DNA templates (30 to 45 ng) were labeled with 3.2 pmol of primer GlyptsRev1 (5'-ATAGGGAAAGCTGGTACGC-3') or M13 -40 forward (5'-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA-3', Amersham Biosciences) and 2  $\mu$ L of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) in a final volume of 10  $\mu$ L. Labeling reactions were performed in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) thermocycler with a initial denaturing step of 96 °C for 3 min followed by 25 cycles of 96 °C for 10 sec, 55 °C for 5 sec and 60 °C for 4 min. Labeled samples were purified by isopropanol precipitation followed by 70% ethanol rinsing. Precipitated products were suspended in 10  $\mu$ L formamide, denatured at 95 °C for 5 min, ice-cooled for 5 min and electroinjected in the automatic sequencer. Sequencing data were collected using the software Data Collection v1.0.1 (Applied Biosystems) Data generated were processed by a suite of programs available at the Universidade Católica de Brasília (<http://www.ucb.br/genolyptus>) prior to assembly with the PHRED (Ewing and Green, 1998; Ewing et al., 1998) and PHRAP

(<http://phrap.org/>) algorithms. Accepted ESTs were selected based on a minimal length of 250 bp with every base having a quality of PHRED higher than 20.

A 1,033 bp fragment of the *EgrSAMDC2* cDNA cloned into pSport1 (Invitrogen) was generated using the *Pst*I restriction enzyme and subcloned into SK<sup>+</sup> pBluescript (Stratagene) for further full sequencing. An internal primer was designed (SAMDC-For, 5'-CAAAGAGAACTCGCCCTCAG-3') and, along with universal SK<sup>+</sup> primers, employed to allow the complete sequencing of the insert.

### *2.2 Plant material and treatments for Northern blot and qRT-PCR analysis*

Culture flasks containing 3 to 4 *E. grandis* seedlings grown *in vitro* for 4 months as described above were submitted to several treatments in duplicate. Treatments consisted of 3 identical sprays into the flasks of the following: distilled water; 0.2 mg/l kinetin; 2 mg/l 1-naphthaleneacetic acid; 0.5 mM abscisic acid; 1.5% yeast extract dissolved in water; 3 min exposure to direct ultraviolet light (254 nm, 2 to 5 cm distance) followed by water sprays; and 0.5 M sodium chloride. Drought treatment consisted in leaving the flasks opened overnight in the culture room. Mechanical wounding was performed by clenching leaves and stems with a flat forceps followed by water sprays and overnight incubation. Cold treatment consisted in leaving flasks during 3 days at 4 °C followed by water spray and overnight at the culture room. Control plants were not sprayed or treated and were simply left along the other flasks in the culture room until harvesting. After the simultaneous overnight incubations, all seedlings were harvested and immediately frozen and stored in liquid nitrogen.

### *2.3 Southern and Northern blot hybridization analysis*

Genomic DNA was extracted from young *E. grandis* leaves by the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) procedure described by Doyle and Doyle (1987). Twenty µg of genomic DNA were digested with *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Bam*HI, *Sal*I and *Pst*I and fractionated by electrophoresis on a 0.8% agarose gel.



Total RNA from *in vitro* grown *E. grandis* seedlings was isolated after the described treatments using the Concert Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions for multi RNA minipreps. RNA was also purified by the same method from roots, leaves, young stems, flowers and vascular tissues of field-grown plants. Ten µg of total RNA were fractioned by electrophoresis in a 1.2% agarose gel.

DNA and RNA fragments were transferred to Hybond N<sup>+</sup> membranes (Amersham Biosciences). Transfer, hybridization and detection were performed using the Gene Images Random Prime Labelling and Gene Images CDP-Star Detection Modules (Amersham Biosciences) following the manufacturer's instructions. The 1,033 bp *Pst*I fragment of the *EgrSAMDC2* cDNA was used as probe.

#### 2.4 Quantitative reverse transcription PCR

Total RNA isolated from *E. grandis* seedlings was treated with DNase I at 37 °C for 30 min prior to use. One µg of total RNA was added to each cDNA synthesis reaction using the Superscript II RT pre-amplification system (Invitrogen). Reactions were performed at 42 °C for 1 h using the primer 3' Smart CDS IIA (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT<sub>30</sub>VN-3'). PCR amplification was carried out using specific primer pairs designed with the employment of the GenScript Corporation's Real-Time PCR Primer Design tool ([www.genscript.com/ssl-bin/app/primer](http://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer)). Primers were synthesized by Integrated DNA Technologies Inc.

Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) was carried out in an Applied Biosystem 7500 real-time cycler. Reaction settings were composed of an initial denaturation step of 5 min at 94 °C followed by 45 cycles of 10 s at 94 °C, 15 s at 63 °C, and 15 s at 72 °C; samples were kept for 2 min at 40 °C for reannealing and then heated from 55 to 99 °C with a ramp of 0.1 °C/s to acquire data to produce the denaturing curve of the amplified products. qRT-PCRs were performed in 20 µl final volume composed of 10 µl of each reverse transcription sample diluted 50 times in 2 µl Platinum Taq 10x PCR buffer (Invitrogen), 1.2 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.4 µl dNTPs 5 mM, 0.4 µl primer pairs at 10 µM, 4.95 µl ultra pure water, 1.0 µl SYBR green (1:100,000, Molecular Probes), and 0.05 µl Platinum Taq DNA polymerase (5

U/ $\mu$ l, Invitrogen). The melting temperatures of all primers were adjusted to 60 °C. qRT-PCR *EgrSAMDC2* primers were 5'-CAGTGGCGTGATCCTTTAGA-3' (SAMDC-RT-for) and 5'-AGTGAGCGAGTTGAGAA-3' (SAMDC-RT-rev, product size of 134 bp). Histone H2B and ribonucleoprotein L23A gene sequences were used as internal controls to normalize the amount of mRNA present in each sample. qRT-PCR primers of the control genes employed were 5'-GAGCGTGGAGACGTACAAGA-3' (HistoneH2B-RT-for), 5'-GGCGAGTTTCTCGAAGATGT-3' (HistoneH2B-RT-rev, product size of 127 bp), 5'-AAGGACCCTGAAGAAGGACA-3' (RibPtnL23A-RT-for), 5'-CCTCAATCTTCTTCATCGCA-3' (RibPtnL23A-RT-rev, product size of 128 bp).

All results were expressed as a relative quantification of the specific SAMDC gene amplification products and the Histone H2B or the ribonucleoprotein L23A internal control genes using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method described by Livak and Schmittgen (2001). Three internal replications per experiment were performed.

## 2.6 Bioinformatic analysis

Clustered DNA sequences of the GENOLYPTUS project database, derived from expressed sequence tags (ESTs) obtained from cDNAs generated from different tissues, organs or growth conditions, were the primary data source for this work. A putative full-length MAPK cDNA was identified and BLASTp and BLASTn programs (Altschul et al., 1997), available at The National Center for Biotechnology Information (NCBI) homepage (<http://www.ncbi.nih.gov>), were used to confirm the identity of the EST in the gene and protein databases. DNA and protein sequence alignments were carried using ClustalW (Higgins et al., 1994) with default parameters and edited using GeneDoc program Version 2.6.002 (Nicholas et al., 1997; <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>). Phylogenetic analysis was performed with the Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) package Version 3.1 (Kumar et al., 2004), according to the parameter of p-distance, pairwise deletion and with the Neighbor-Joining method. Confidence of tree topology was calculated by bootstrap after 2000 replications.

### 3. Results

#### 3.1 Isolation and characterization of *E. grandis* SAMDC complete cDNAs

As part of the GENOLYPTUS Project: The Brazilian Research Network on the *Eucalyptus* Genome ([www.ucb.br/genolyptus](http://www.ucb.br/genolyptus)), our group screened for expressed sequence tags (ESTs) related to SAMDC among 120,000 ESTs available. A total number of 24 ESTs, clustered into 2 groups of 20 and 4 ESTs each, showed deduced peptide sequences with strong homologies to known SAMDC sequences (not shown). One putatively full-length SAMDC cDNA was identified among the sequences in each cluster, and named *EgrSAMDC1* and *EgrSAMDC2*. The complete sequences of both genes were deduced from the alignments of the members of each cluster. *EgrSAMDC2* was further subcloned into SK<sup>+</sup> pBluescript and fully sequenced. Complementary DNA identity for both sequences was confirmed by BLASTp search and multiple sequence alignment analysis. *EgrSAMDC1* and *EgrSAMDC2* cDNA sequences were submitted to the GenBank under the accession numbers \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_ (to be defined).

*EgrSAMDC1* cDNA consisted of 1,815 bp with a 3'-untranslated region of 294 bp and an ORF of 1,044 bp encoding 348 amino acids. *EgrSAMDC2* cDNA consisted of 1,714 bp including the poly(A) tail in a 3'-untranslated region of 261 bp and an ORF of 1,083 bp encoding 361 amino acids. The deduced polypeptide sequences of *EgrSAMDC1* and *EgrSAMDC2* were compared with known SAMDCs, as shown in Fig. 1. The alignment indicated the presence of several highly conserved regions in both *EgrSAMDC* deduced proteins. One region included the sequence LSESSLF, marked by a triangle in Fig. 1, representing the putative pro-enzyme cleavage site, which is important to the production of the mature form of the enzyme. Another conserved region clearly noticed was the PEST sequence, TIHVTPEDGFSYASFE, from residues 245 to 260 in both *EgrSAMDC* genes. This sequence was shown to be probably associated with the rapid turnover of the SAMDC protein (Rogers et al., 1986). Three glutamic residues (Glu-11, Glu-178 and Glu-256), necessary for stimulation of the processing of the human pro-enzyme by putrescine (Xiong et al., 1997)

were also conserved in both EgrSAMDC deduced amino acid sequences and in other plant SAMDC proteins (Fig. 1).

In the long 5' untranslated region of 477 and 370 bp of *EgrSAMDC1* and *EgrSAMDC2*, respectively, small uORFs of 150 and 153 bp were identified. These small uORFs potentially encode a peptide of 50 and 51 amino acid residues, respectively, highly conserved when compared with SAMDC sequences from other plants (Fig. 2A). Furthermore, a tiny uORF, overlapping the small uORF, was also found in both sequences of *Eucalyptus* (Fig. 2B). These tiny uORFs of 9 bp putatively encode a peptide of only two residues, suggested to be involved in post-transcriptional regulation (Ruan et al., 1996; Mize et al., 1998).

The relationship among the plant SAMDCs was investigated by the generation of a phylogenetic tree using the deduced amino acid sequences derived from various known plant, animal and yeast SAMDC-encoding sequences (Fig. 3). The analysis showed that EgrSAMDC2 clustered with one of the SAMDC amino acid sequences from apple (MdSAMDC2) and one from sweet potato (IbaSAMDC). EgrSAMDC2 share a similarity of 83 % with MdSAMDC2 and 81 % with IbaSAMDC. EgrSAMDC1 did not cluster with any other SAMDC protein, as well as MdSAMDC1 (Fig. 3). The two *Eucalyptus* SAMDCs presented 66 % of identity and 79 % of similarity with each other, and shared a high degree of sequence similarity with other plant homologues, ranging from 67 to 83 %. Other clusters consisted of seven monocot SAMDCs, including two from rice and one each from daffodil, orchid, maize, *tritordeum* and wheat. The phylogenetic analysis resulted in the perfect clustering of SAMDC sequences derived from members of the same family. For instance, SAMDCs from soybean and pea (Fabaceae), from *Arabidopsis* and mustard (Brassicaceae), and from tobacco, potato and *Datura stramonium* (Solanaceae) fell under distinct clusters. SAMDCs from human, frog and yeast clustered apart from plant amino acid sequences.

### 3.2 Gene-copy number of *Eucalyptus* SAMDC

Southern blot analysis was carried out to estimate the number of *EgrSAMDC*-like genes into the *E. grandis* genome. Genomic DNA was digested with *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *BamHI*, *SalI* and *PstI* restriction enzymes, which did not cut the *EgrSAMDC2* cDNA in the probe

homologue region. As shown in Fig. 4, multiple hybridization signals were observed when the 1,033 bp fragment of the *EgrSAMDC2* cDNA was used as probe, with at least two strong signals in most lanes. This pattern indicates that there are at least two genomic copies of the *SAMDC* gene into the *E. grandis* genome, which is consistent with our previous screening result of the Genolyptus EST databank where only two clusters of ESTs were found with consistent homology to SAMDCs from other plants.

### 3.3 *SAMDC* gene expression in *E. grandis* tissues and seedlings treated by different stimuli

To determine the pattern of *EgrSAMDC* mRNA accumulation in different organs and tissues of *E. grandis*, Northern blot analysis was performed with total RNA extracted from young stems, vascular tissues of mature trees, young leaves and opened flowers of *E. grandis*. As shown in Fig. 5A, *SAMDC* mRNA was detected in all tissues tested. Nevertheless, highest levels of *EgrSAMDC* steady-state mRNA were clearly detected in flowers, while more moderate levels were observed in stems and leaves. Because the probe derived from *EgrSAMDC2* (1,033 bp) covered an extensive 5' mRNA sequence, including many conserved regions, we believe that the Northern blot result represents the sum of the expression patterns of (at least) both *SAMDC* genes.

The effect of various environmental stresses and plant growth regulators on the expression of *EgrSAMDC* was also examined. Total RNA was isolated from 4-months old *in vitro* seedlings subjected to different treatments. As shown in Fig. 5B, the exposure to UV light, injuries, yeast extract or ABA did not change *SAMDC* mRNA levels significantly relative to the controls (seedlings not treated or treated with water). However, *SAMDC* steady-state mRNA levels decreased two to three fold after NAA and kinetin treatments. Surprisingly, an equivalent decrease in steady-state mRNA levels for *SAMDC* was also observed in seedlings submitted to the abiotic stresses promoted by salinity, cold and drought. Again, Northern blot analysis may express the result for both *E. grandis* *SAMDC* genes.

Since the probe employed in the Northern blot analysis might have hybridized to at least both *SAMDC* transcripts of *E. grandis*, specific primers for *EgrSAMDC2* were designed and used in qRT-PCR analysis. The expression of the *EgrSAMDC2* gene was normalized against

the expression of the putative genes encoding histone H2B and the ribonucleoprotein L23A. As shown in Fig. 6 and considering the normalization of *EgrSAMDC2* expression against both constitutive genes, *EgrSAMDC2* was drastically reduced after UV and drought treatments of the seedlings. However, ABA and salt slightly induced *EgrSAMDC2* expression. All other treatments did not significantly affect the expression of the *EgrSAMDC2* gene. Although preliminary, these results suggest that the *EgrSAMDC2* gene might be more related to plant response against high salinity, possibly via ABA signaling, than to other environmental or biotic-like stress responses.

#### 4. Discussion

Among 120,000 ESTs generated in the GENOLYPTUS Project, we selected and analyzed two cDNAs potentially encoding SAMDC. Both sequences were considered full-length judging their comparable sizes and identities of the deduced amino acid sequences to known plant SAMDCs. These sequences were originally derived from 40-days old seedlings of *E. grandis* grown *in vitro* and named *EgrSAMDC1* and *EgrSAMDC2*. Alignment of the predicted amino acid sequences of both *E. grandis* SAMDCs with known SAMDC proteins from other plants allowed us to identify several conserved regions, particularly the proenzyme cleavage site and the putative PEST domain. It has been reported that in plants, unlike mammals and yeasts, the amino acid sequences LSESSLF and TIHVTPEDGFSYASFE were indispensable for processing of the proenzyme (Xiong et al., 1997) and rapid protein degradation (Rogers et al., 1986), respectively, as well as essential for the biological function of the SAMDC enzyme *in vivo* (Schröder and Schröder, 1995). SAMDC proteins often contain at least one PEST domain that determines half-lives shorter than 2 h (Cohen, 1998). Therefore, we conclude that both *EgrSAMDC* proteins are possibly synthesized as inactive proenzymes and that the half-lives of the mature proteins may be also relatively short.

The long 5' untranslated region of both *EgrSAMDC* cDNAs contained the two highly conserved sequences named small and tiny uORFs. Similar small and tiny uORFs were found in the 5' leader sequences of other plant SAMDC genes, varying between 49 to 54 amino

acids and 2 to 3 amino acids, respectively (Franceschetti et al., 2001, Tian et al., 2004; Hao et al., 2005). The small uORF may play a role in the translational repression of *EgrSAMDC* genes in response to PAs (Franceschetti et al., 2001). Because the last nucleotide (A) of the tiny uORF stop codon was the first nucleotide of the initiating codon (ATG) of the small uORF, it was suggested that if the ATG of the tiny uORF was identified by the translational machinery, it was unlikely that the ATG of the small uORF would be recognized (Franceschetti et al., 2001). Therefore, both uORFs in plant *SAMDC* genes may play a repressive role in regulating the translation of the encoding ORF, as concluded by Hanfrey et al. (2002).

More than one gene copy was identified for most plant *SAMDC* genes characterized up to now including those from carnation, *Arabidopsis*, tobacco, mustard, rice and apple (Lee et al., 1997a; Lee et al., 1997b; Franceschetti et al., 2001; Pillai and Akiyama, 2004; Hao et al., 2005). Furthermore, Franceschetti et al. (2001) identified four additional forms of *SAMDC* genes in *Arabidopsis*, each of them defective in some way and probably not expressed (pseudogenes). In *Brassica juncea*, it was also characterized a total of four *SAMDC* mRNA forms (Hu et al., 2005b). In this work, based on the genomic Southern blot pattern of hybridization and the finding of only two clusters of ESTs encoding *SAMDC* in a population of 120,000 valid ESTs, we identified two different *SAMDC* gene copies in *E. grandis*, each copy most likely encoding *EgrSAMDC1* and *EgrSAMDC2*. This finding is in agreement to what was described for most *SAMDC* genes from plants.

Based on Northern blot hybridizations, there is a difference in the abundance of *EgrSAMDC* mRNAs in different *Eucalyptus* tissues, markedly more abundant in flower tissues. A significant expression could also be observed in young stems and leaves, with lower levels observed in vascular tissues of adult trees. These results corroborate reported data affirming that the expression level of most PA biosynthetic genes is higher in actively growing tissues than in mature or senescent ones (Mad Arif et al., 1994; Marco and Carrasco, 2002). *AdoMetDC1* and *AdoMetDC2* mRNAs from *Arabidopsis* also displayed a considerable difference in their organ distribution, since *AdoMetDC2* higher levels of steady-state mRNAs were observed in leaves and inflorescences, while *AdoMetDC1* was abundant and ubiquitous (Franceschetti et al., 2001). Such results were also observed for the carnation *CSDC16*

transcript, which was more abundant and ubiquitous than the *CSDC9* transcript, the former being mostly localized in stems and floral parts (Lee et al., 1997a). Similarly, the expression levels of the apple *MdSAMDC1* was positively correlated to growth rate during the culture period of cells in suspension, while that of *MdSAMDC2* did not (Hao et al., 2005). According to the authors, these findings suggest that *MdSAMDC1* and *MdSAMDC2* may function differentially in developmental and physiological processes, and that *MdSAMDC1* seems to be mainly involved in fruit development and cell growth, compared with *MdSAMDC2*. One possible explanation, which probably applies to most gene families, is that one gene might be more responsive to environmental signals than the other gene.

Preliminary qRT-PCR experiments using primers specific to *EgrSAMDC2* and 4-months old *E. grandis* seedlings grown *in vitro* showed that the abundance of mRNAs for this gene is increased after salt and abscisic acid treatments, and drastically reduced after UV irradiation and drought treatments. Cold, biotic and other hormone-like signals did not change the level of expression of *EgrSAMDC2*. Cold, drought and high salinity are closely related stresses that normally induce similar responses in plants mediated by ABA-dependent and ABA-independent routes (reviewed in Zhu, 2002). Hence, it is interesting to notice that *EgrSAMDC2* is positively regulated by ABA and salt but down-regulated by drought. Nevertheless, before taking these results as definitive conclusions, it will be important to repeat qRT-PCR experiments in more detail, with biological duplicates and time-courses, since only one assay was performed and in one time lapse (16 h) after treatments. It is also important to perform new experiments with primers specific to either *EgrSAMDC1* or *EgrSAMDC2*, in order to differentiate each contribution in the apparently constitutive expression observed in the Northern blot analysis.

## **Acknowledgements**

Authors would like to thank M.Sc Norton Borges Jr., João Bauer and colleagues (Aracruz Celulose e Papel S.A.) for the donation of *E. grandis* seeds and for their help in collecting plant material from field grown trees; Dr. Arthur G. Fett Neto and M.Sc. Joséli



Schwambach (UFRGS) for culture room facilities and for yielding *E. grandis in vitro* grown plants; M.Sc. Felipe Fenselau de Felippes (UFRGS) for his help with Southern and Northern blot experiments; This work was supported by The Brazilian Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCT) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/MEC) which granted a M.Sc. scholarship to A.P. Körbes. Finally, we are most grateful to all researchers from private and public institutions that are part of the GENOLYPTUS Project.

## References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped-Blast and Psi-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Bolle, C., Herrmann, R.G., Oelmüller, R., 1995. A spinach cDNA with homology to S-adenosylmethionine decarboxylase. *Plant Physiol.* 107, 1461-1462.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J., 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* 140, 103-125.
- Capell, T., Bassie, L., Christou, P., 2004. Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *PNAS* 101, 9909-9914.
- Cohen S.S., 1998. A guide to the polyamines. Oxford University Press, New York, pp 1-595.
- Doyle, J., Doyle, L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15.

- Evans, P.T., Malmberg, R.L., 1989. Do polyamines have roles in plant development? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 235-269.
- Ewing, B., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred, II: Error probabilities. *Genome Res.* 8, 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred, I: Accuracy assessment. *Genome Res.* 8, 175-185.
- Franceschetti, M., Hanfrey, C., Scaramagli, S., Torrigiani, P., Bagni, N., Burtin, D., Michael, A.J., 2001. Characterization of monocot and dicot plant S-adenosyl-l-methionine decarboxylase gene families including identification in the mRNA of a highly conserved pair of upstream overlapping open reading frames. *Biochem. J.* 353, 403-409.
- Hanfrey, C., Franceschetti, M., Mayer, M.J., Illingworth, C., Michael, A.J., 2002. Abrogation of upstream open reading frame-mediated translational control of a plant S-adenosylmethionine decarboxylase results in polyamine disruption and growth perturbations. *J. Biol. Chem.* 277, 44131-44139.
- Hao, Y.-J., Zhang, Z., Kitashiba, H., Honda, C., Ubi, B., Kita, M., Moriguchi, T., 2005. Molecular cloning and functional characterization of two apple S-adenosylmethionine decarboxylase genes and their different expression in fruit development, cell growth and stress responses. *Gene* 350, 41-50.
- Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

- Hu, W.-W., Gong, H., Pua, E.C., 2005a. The pivotal roles of plant S-adenosylmethionine decarboxylase 5' untranslated leader sequence in regulation of gene expression at the transcriptional and post-transcriptional levels. *Plant Physiol.* 138, 276-286.
- Hu, W.-W., Gong, H., Pua, E.C., 2005b. Molecular cloning and characterization of S-adenosylmethionine decarboxylase genes from mustard (*Brassica juncea*). *Physiol. Plant.* 124, 25-40.
- Kakkar, R.K., Sawhney, V.K., 2002. Polyamine research in plants - a changing perspective. *Physiol. Plant.* 116, 281-292.
- Kashiwagi, K., Taneja, S.K., Liu, T.Y., Tabor, C.W., Tabor, H., 1990. Spermidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Biosynthesis and processing of a proenzyme form of S-adenosylmethionine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 265, 22321-22328.
- Konstantinos, A., Paschalidis and Kalliopi, A., Roubelakis-Angelakis, 2005. Spatial and temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs/tissues of the tobacco plant. Correlations with age, cell division/expansion, and differentiation. *Plant Physiol.* 138, 142-152.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment Briefings in Bioinformatics 5, 150-163.
- Lee, M.M., Lee, S.H., Park, K.Y., 1997a. Characterization and expression of two members of the S-adenosylmethionine decarboxylase gene family in carnation flower. *Plant Mol. Biol.* 34, 371-382.

- Lee, T., Liul, J.-J., Pua, E.-C., 1997b. Molecular cloning of two cDNAs (accession nos. X95729 and U80916) encoding S-adenosyl-L-methionine decarboxylase in mustard (*Brassica juncea* fL.1 Czern & Coss). *Plant Physiol.* 115, 1287.
- Li, Z.-Y., Chen, S.-Y., 2000. Differential accumulation of the S-adenosylmethionine decarboxylase transcript in rice seedlings in response to salt and drought stresses. *Theor. Appl. Genet.* 100, 782-788.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25, 402-408.
- Mad Arif, S.A., Taylor, M.A., George, L.A., Butler, A.R., Burch, L.R., Davies, H.V., Stark, M.J., Kumar, A., 1994. Characterisation of the S-adenosylmethionine decarboxylase (*SAMDC*) gene in potato. *Plant Mol. Biol.* 26, 327-338.
- Marco, F., Carrasco, P., 2002. Expression of the pea S-adenosylmethionine decarboxylase is involved in developmental and environmental responses. *Planta* 214, 641-647.
- Martin-Tanguy, J., 2001. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Reg.* 34, 135-148.
- Mize, G.J., Ruan, H., Low, J.J., Morris, D.R., 1998. The inhibitory upstream open reading frame from mammalian S-adenosylmethionine decarboxylase mRNA has a strict sequence specificity in critical positions. *J. Biol. Chem.* 273, 32500-32505.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B., Deerfield, D.W., 1997. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW.NEWS* 4, 14.

- Pajunen, A., Crozat, A., Jane, O.A., Ihalainen, P.H., Stanley, B., Madhubala, R., Pegg, A.E., 1988. Structure and regulation of mammalian S-adenosylmethionine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 263, 17040-17049.
- Pillai, M.A., Akiyama, T., 2004. Differential expression of an S-adenosyl-L-methionine decarboxylase gene involved in polyamine biosynthesis under low temperature stress in *japonica* and *indica* rice genotypes. *Mol. Gen. Genomics* 271, 141-149.
- Rogers, S., Wells, R., Rechsteiner, M., 1986. Amino acid sequences common to rapid degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364-368.
- Roy, M., Wu, R., 2002. Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increase polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. *Plant Sci.* 163, 987-992.
- Ruan, H., Shantz, L.M., Pegg, A.E., Morris, D.R., 1996. The upstream open reading frame of the mRNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase is a polyamine-responsive translational control element. *J. Biol. Chem.* 271, 29576-29582.
- Schröder, G., Schröder, J., 1995. cDNAs for S-adenosyl-L-methionine decarboxylase from *Catharanthus roseus*, heterologous expression, identification of the proenzyme-processing site, evidence for the presence of both subunits in the active enzyme, and a conserved region in the 5' mRNA leader. *Eur. J. Biochem.* 228, 74-78.
- Tian, A.-G., Zhao, J.-Y., Zhang, J.-S., Gai, J.-Y., Chen, S.-Y., 2004. Genomic characterization of the S-adenosylmethionine decarboxylase genes from soybean. *Theor. Appl. Genet.* 108, 842-850.
- Tiburcio, A.F., Altabella, T., Borrel, A., Masgrau, C., 1997. Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol. Plant.* 100, 664-674.

- Waie, B., Rajam, M.V., 2003. Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine gene. *Plant Sci.* 164, 727-734.
- Xiong, H., Stanley, B.A., Tekwani, B.L., Pegg, A.E., 1997. Processing of mammalian and plant S-adenosylmethionine decarboxylase pro-enzymes. *J. Biol. Chem.* 272, 28342-28348.
- Zhu, J.-K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 53, 247-273.
- Ziosi, V., Scaramagli, S., Bregoli, A.M., Biondi, S., Torrigiani, P., 2003. Peach (*Prunus persica* L.) fruit growth and ripening: transcript levels and activity of polyamine biosynthetic enzymes in the mesocarp. *J. Plant Physiol.* 160, 1109-1115.

Fig. 1. Alignment of the deduced amino acid sequences of *EgrSAMDC1* and *EgrSAMDC2* and those of *A. thaliana* (GenBank accession no. U63633), *Nicotiana tabacum* (U91924), *Malus sp.* (AB077442 and AB077441), *Oryza sativa* (Y07766), *Solanum tuberosum* (Z11680), *Pisum sativum* (U60592) and *Zea mays* (Y07767). Black-shaded residues are identical while light gray-shaded residues are similar in all proteins. The highly conserved sequence LSESSM and the PEST motif are marked by triangle and underlined, respectively. Filled circles indicate the aspartic residues necessary for the stimulation of processing in the human enzyme by putrescine.

▽

```

EgrSAMDC1 : ---MDL---EVSATGFEGYEKRLEISFYEPGLFQDPEERGLRSLRSQAQLDEITKPAEACTIVSLSLNDHVDVSYVLSSESLFV : 75
EgrSAMDC2 : MAL-----SVSATGFEGYEKRLELTFYEPGLFADPEEMGLRSLRSKSQLDEITKLAEACTIVSLSLNEFVDVSYVLSSESLFV : 75
MdoSAMDC2 : MAV-----PVSATGFEGYEKRLEVSFEPEGLFADPEKMGRLRSLRSQAQIDELITPAEACTIVSLSLNDHVDVSYVLSSESLFV : 75
NtasAMDC : --MDSAL---PVSATGFEGYEKRLEISFYEPGLFADPEKMGRLRSLRSQAQIDELITGPAEACTIVDLSLNDHVDVSYVLSSESLFV : 77
StusAMDC : MEMD--L---PVSATGFEGYEKRLEISFYEPGLFADPEKMGRLRSLRSQAQIDELITGPAEACTIVDLSLNDHVDVSYVLSSESLFV : 77
PsasAMDC : MAV-----SATGFEGYEKRLEISFDPEGLFSDPEQGRGLRSLRSKSQLDEITLAPAEACTIVSLSLANEDVDVSYVLSSESLFV : 73
MdoSAMDC1 : MAMEG-----SATGFEGYEKRLEIAFEPSIFLDPEERGLRSLRSQAQIDELITDCAEACTIVSLSLNDHVDVSYVLSSESLFV : 75
AthSAMDC : MAME-----SATGFEGYEKRLEVSFEPSIFLDPEERGLRSLRSQAQIDELITPAEACTIVSLSLNDHVDVSYVLSSESLFV : 73
OsasAMDC : MGVLSAADPPFVSATGFEGYEKRLEITFSEAPVFDPEERGLRSLRSQAQIDSVLDDARCTIVSLSLNDHVDVSYVLSSESLFV : 82
ZmasAMDC : MAVLSAADASPVSATGFEGYEKRLEITFSEAPVFDPEERGLRSLRSQAQIDSVLDDARCTIVSLSLNDHVDVSYVLSSESLFV : 82

```

```

EgrSAMDC1 : YPYKIVIKTCGTTKLLKSIPELNLGASLSLAVRSKYTRGCEFLCPGAQPYPHRNFSEEVYVLDTRYPGNLGSGRKAAYLLGGS : 157
EgrSAMDC2 : YPYKLIKTCGTTKLLLSIPAILRLADSLSLVKSRYTRGSEFIEPGAQHFPHRNFSEEVAVLDYTPGNLGAAGSKAYLMGSP : 157
MdoSAMDC2 : YPYKVIKTCGTTKLLRSIPAILRLADSLSLAVKSVRYSRGSEFIEPGAHPSPHRNFSEEVAVLDGHPGKLGASKAYLMGSP : 157
NtasAMDC : YSYKIIKTCGTTKLLLAIPAILKLAETLSLKVQDVRVYTRGSEFIEPGAQSFPHRNFSEEVAVLDGYPGKLAAGSKAYLMGSP : 159
StusAMDC : YSYKIIKTCGTTKLLLSIPAILRLAETLSLKVQDVRVYTRGSEFIEPGAQSFPHRNFSEEVAVLDGYPGKLAAGSKAYLMGSP : 159
PsasAMDC : YAYKLIKTCGTTKLLLSIPAILKLAETLSLAVRSKYTRGSEFIEPGAQSFPHRNFSEEVAVLDGHPGKLGSGMAYLLGGS : 155
MdoSAMDC1 : HPMKMIKTCGTTKLLRVIPVVLQLAETLSLAVRSKYTRGSEFIEPGAQTYPHRNFSEEVAVLDYTPGNLGAAGSKAYLMGSP : 157
AthSAMDC : YPYKVIKTCGTTKLLLSIPAILKLAGLSLAVKSVRYTRGSEFIEPGAQSFPHRNFSEEVAVLDGHPGKLGASKAYLMGSP : 155
OsasAMDC : YSDKIVIKTCGTTKLLLTIPRILBLAEBLSMPLAAVKYSRGTEFIEPGAQFAPHRNFSEEVAVLNRYPGHLKSGGNAYVIGDP : 164
ZmasAMDC : YPLKIVIKTCGTTKLLLTIPRILBLAEBLSMPLAAVKYSRGTEFIEPGAQFAPHRNFSEEVAVLNRYPGHLKSGGNAYVIGDP : 164

```

```

EgrSAMDC1 : NKT-KRQHWVYSASADEVESV-----SPVYTMICMTGLNKESVFFKQSGS---AAAMTINSGRKILPNSEICDFDF : 228
EgrSAMDC2 : ERA-QKQHWVYSASAEKTSL-----SDSVFTLEMCMTGDKQRASVFFKENSFS---AAAMTEESGRKILPKSDICDFDF : 228
MdoSAMDC2 : DKT-QKQHWVYSASAEALASLLWGSRQSGPTYTLEMCMTGDKRKRASVFFKSDASS---AAGMTVESGRKILPKSDICDFDF : 234
NtasAMDC : DKA-QKQHWVYSASAGPIQS-----NDPVYTMICMTGLDREKASVFFKTEGSS---AAHMTVRSGRKILPNSEICDFDF : 230
StusAMDC : DKT-QKQHWVYSASAGSVQS-----NDPVYTMICMTGLDREKASVFFKTEESS---AAHMTVRSGRKILPKSEICDFDF : 230
PsasAMDC : DEA-QKQHWVYSASDSVSP-----EGSVYTMICMTGLDREKASVFFKQTS---AAEMTVNSGRKILPKSEICDFDF : 226
MdoSAMDC1 : DGP-QKQHWVYSATASASAF-----VEPVYTMICMTGLDREKASVFFKSESS---ATTMTNESGRKILPKSDICDFDF : 228
AthSAMDC : DET-KKQHWVYSASAQDSSNC-----NNVYTMICMTGLDREKAAVFFKDEADK---TGSMTDNSGRKILPKSEICDFDF : 227
OsasAMDC : AKPGQKQHWVYATQHP-----EQPMVYTMICMTGLDREKASVFFKTSADGHTSCAKEMTKLSDICDFDF : 237
ZmasAMDC : ARPQKQHWVYATEYP-----EQPMVYTMICMTGLDREKACVFFKTNADGNTCAKEMTKLSDICDFDF : 237

```

```

EgrSAMDC1 : EPCGYSMNAIBGSAFSTHHTVTPEDGFSYASFBVAGVDFPKDINYNQLIGRVLACFRPREFSVAVHA-NVAAKSLEQNCSEINVK : 309
EgrSAMDC2 : DPCGYSMNAIBGSGISTHHTVTPEDGFSYASFBVAGVDFKAADLSQLLQVRLVCFEPEFESVALHS-DLAGEDLVSRFELDLK : 309
MdoSAMDC2 : EPCGYSMNSIBGNVSTHHTVTPEDGFSYASFBVAGVDFKDVNLTQLLYRVLDFKPEFESIALHTTSTAGEDLDAKELDLK : 316
NtasAMDC : EPCGYSMNSIBGAALSTHHTVTPEDGFSYASFBVAGVDFKMTKMLGFLVERVLACEEDEFESIALHA-DVATKLLERVCSDVK : 311
StusAMDC : EPCGYSMNSIBGAAVSTHHTVTPEDGFSYASFBVAGVDFKMTKMLGFLVERVLACEEDEFESVALHA-DVATKLLERICSDVK : 311
PsasAMDC : EPCGYSMNSIBGSAVSTHHTVTPEDGFSYASFBTAGMDLKAINLNEVMRVLACFQPEFESVAVHV-DNASKSFEQGCLLDVK : 307
MdoSAMDC1 : DPCGYSMNSIBGAAISTHHTVTPEDGFSYASFBTAGMDLKDVLNQLVERVLVCFQPEFESIAVHA-NVVSLSLQHSIVDLK : 309
AthSAMDC : EPCGYSMNSIBGDASTHHTVTPEDGFSYASFBVAGVDFNTLDSQLVTRVLSCEEPKOPSVAVHS-SVGNASKYKPEIVDLE : 308
OsasAMDC : EPCGYSMNAIBGSAFSTHHTVTPEDGFSYASFBVAGVDFASTLAYGDLVKKVLRCFEPEFESVAVTIFGGHGHAGTWAKELNAD : 319
ZmasAMDC : EPCGYSMNAIBGSAFSTHHTVTPEDGFSYASFBVAGVDFATALSVDLKKVLRCFEPEFESVAVTIFGGRGHAGTWGKALGAE : 319

```

```

EgrSAMDC1 : GYCSGERCLBELGAGG-SIMYQRFVMTGRS---ARPTMLISKI----- : 348
EgrSAMDC2 : GYSAGETSCBAGLGG-SIMYMSEFAGTGS---GSPRSILKCCWS-----EDEKDEEVEE---K----- : 361
MdoSAMDC2 : GYCCGSSYBGLGLGG-AMVYHSEFVKDDSG---SQSPRSILKCCWS-----EDEKDEEVEEIGMAKI----- : 374
NtasAMDC : GYSLAENSPPEFEGGG-SIVYQKPTR--TPF---CGSPKSVLKGCKW-----EDEKKEKE----- : 361
StusAMDC : GYSLAENSPPEFEGGG-SIVYQKPTR--TPY---CESPKSVLKGCKW-----E-EKEKKE----- : 360
PsasAMDC : GYCEEKSHQGLMSG-SVYVQKFLK--TSY---CGSPRSTLK-CWK-----DEDEE----- : 353
MdoSAMDC1 : GYCRESSHBEGLGG-AIVYQRFK--TER---CGSPRSTLKGCWR-----EEEEEDY----- : 358
AthSAMDC : DYGCRRFTFBSLGEESGTVMYQTFEKLK---YCGSPRSTLKCEWSSNNSCSEDEKDEGI----- : 366
OsasAMDC : AYKCNNMVEQLPCGG-LLVYQSEFATEDVPAVAGSPKSVLHC-----FEAENMNVN-PAVP : 373
ZmasAMDC : VYDCNNMVEQLPCGG-LLVYQSECAEDA-VAT-SPKSVFHC-----FDGENVESAPPM : 372

```



Fig. 2. (A) Alignment of the predicted amino acid sequences of small ORFs of *EgrSAMDC1* and *EgrSAMDC2* and those of *A. thaliana*, *N. tabacum* (AF033100), *Malus sp.*, *O. sativa* and *Z. mays*. GenBank accession numbers were indicated in the legend of Fig. 1. Black-shaded residues are identical while light gray-shaded residues are similar in all proteins. (B) Tiny and small uORFs identified in the 5'-end of the *EgrSAMDC1* and *EgrSAMDC2* cDNAs.

**A**

```

EgrSAMDC1 : MESKGGKMSSSKPS--S-FYEAPLGYRIEDVRENGGIKKFSAAYSNCVRKPS : 50
EgrSAMDC2 : MESKGGKKKSSSSK--SLFYEAPLGYSIEDLRPHGGIKKFSAAYSNCARKPS : 51
MdoSAMDC2 : MESKGGKRDSSSSK--SLFYEAPLGYSIEDVREPHGGIKKFSAAYSNCARKPS : 51
MdoSAMDC1 : MESKGGKKSSSSSKS--SLFYEAPLGYSIEDIRENGGIKKFSAAYSNCARKPS : 53
AthSAMDC  : MESKGGKKKSSSSS--SLFYEAPLGYSIEDVRENGGIKKFSSVYSNCSKRPS : 51
NtaSAMDC  : MESKGGK--NSSSK--SLFYEAPLGYSIEDVRENGGIKKFSAAYSNCARKPS : 49
OsaSAMDC  : MESKGGKKKSSSSR--SLMYEAPLGYSIEDVREAGGVKKEQSAAYSNCAKKPS : 51
ZmaSAMDC  : MESKGGKK--SSSSR--SMFYEAPLGYSIEDVREAGGVKKEQSAAYSNCAKKPS : 50

```

**B**

```

EgrSAMDC1  . . . . .ACTCAATGATCTAATGGAGTCAAAGGTGGCAA. . . . .
EgrSAMDC2  . . . . .ACTGAATGAACTAAATGGAGTCAAAGGTGGGAA. . . . .

```

Tiny uORF
Small uORF

Fig. 3. Phylogenetic tree showing the relatedness among plant SAMDC main ORFs. The tree was constructed using the ClustalW alignment of the deduced amino acid sequences of different plant and non-plant organisms, including EgrSAMDC1 and EgrSAMDC2. The sequences used (and GenBank accession numbers) are from *Solanum tuberosum* (StuSAMDC, Z11680); *Datura stramonium* (DstSAMDC, Y07768); *Nicotiana tabacum* (NtaSAMDC, U91924); *Catharanthus roseus* (CroSAMDC, U12573); *Spinacia oleracea* (SolSAMDC, X81414); *Dianthus caryophyllus* (DcaSAMDC1 and DcaSAMDC2, U38526; U38527); *Pisum sativum* (PsaSAMDC, U60592); *Glycine max* (GmaSAMDC, AF488307); *Vitis vinifera* (VviSAMDC, AJ567368); *Malus x domestica* (MdoSAMDC1 and MdoSAMDC2, AB077441 and AB077442); *Ipomoea batatas* (IbaSAMDC, AF188998); *Arabidopsis thaliana* (AthSAMDC1 and AthSAMDC2, U63633 and AJ251915); *Brassica juncea* (BjuSAMDC1 and BjuSAMDC2, U80916 and U95729); *Dendrobium crumenatum* (DcrSAMDC, AF420239); *Narcissus pseudonarcissus* (NpsSAMDC, AY232672); *Oryza sativa* (OsaSAMDC1 and OsaSAMDC2, Y07766 and AJ251899); *Triticum aestivum* (TaeSAMDC, AF117660); *Hordeum chilense x durum* (HvuSAMDC, X83881); *Zea mays* (ZmaSAMDC, Y07767); *Sacharomices cerevisiae* (SceSAMDC, M38434); *Xenopus laevis* (XlaSAMDC, S82621); *Homo sapiens* (HsaSAMDC, M21154). Filled circles indicate branches with bootstrap values of 100.

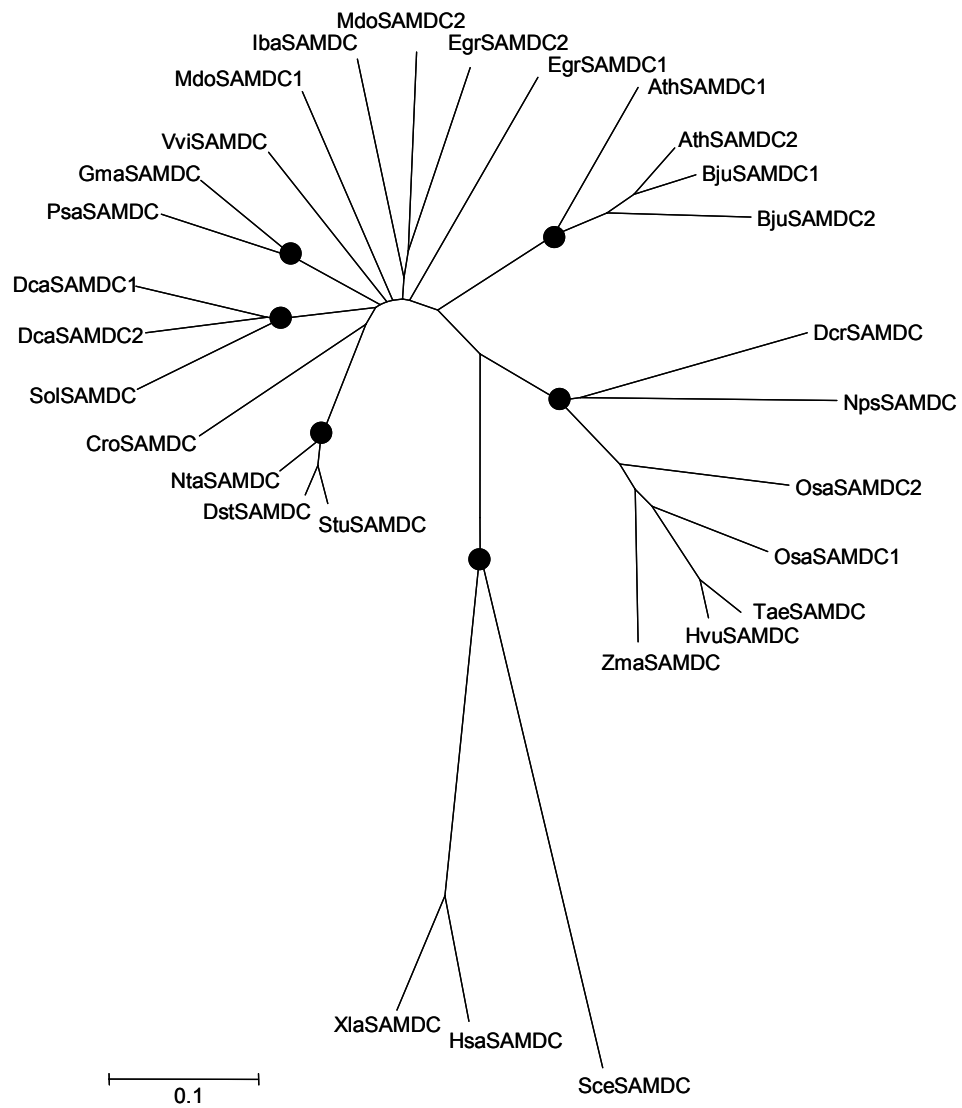


Fig. 4. DNA hybridization analysis of *SAMDC-like* genes in *E. grandis*. Ten micrograms of genomic DNA isolated from *E. grandis* seedlings were digested with *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *BamHI*, *SalI* or *PstI*, fractionated on a 0.8% agarose gel and, after electrophoresis, transferred to a nylon membrane and hybridized with a *EgrSAMDC2* cDNA fragment (1,033 bp) probe. Relative DNA fragment lengths in kb are indicated in the left.

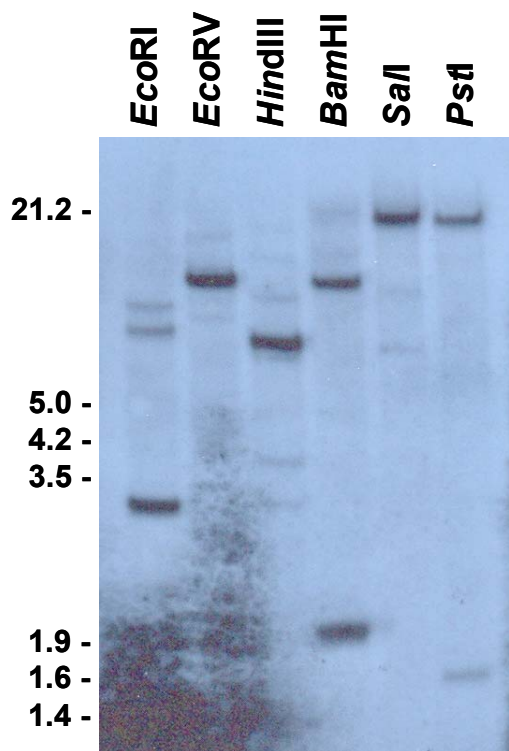


Fig. 5. Northern blot analysis of the *E. grandis SAMDC* gene expression. (A) Northern blot hybridization of the *EgrSAMDC2* cDNA fragment with total RNA extracted from young stems, young leaves, vascular tissues (VT) of adult tree trunks and opened flowers of *E. grandis*. (B) *EgrSAMDC* mRNA expression pattern in seedlings submitted to different stimuli: distilled water (W); kinetin (Kin); 1-naphthaleneacetic acid (NAA); abscisic acid (ABA); yeast extract (EL, elicitor); ultraviolet light (UV); mechanical wounding (MW); sodium chloride (salt) and drought. Auto radiographic films showing the hybridization signals are represented in the upper panels. Photographs of 1.2% agarose gels containing equal amounts of total RNA employed in the Northern analysis are indicated in the lower panels.

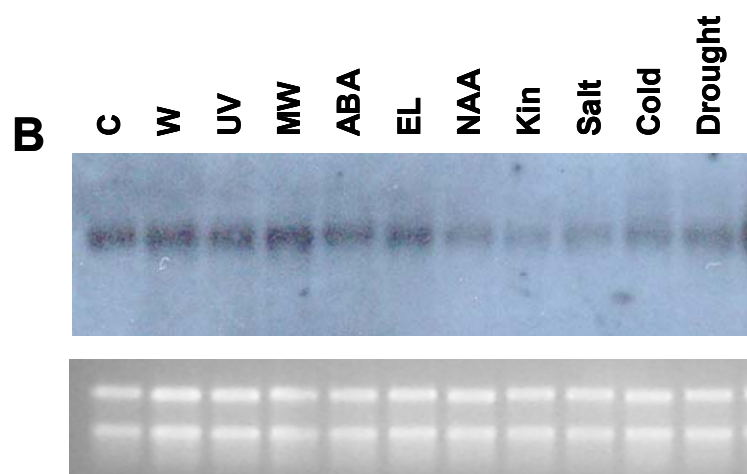
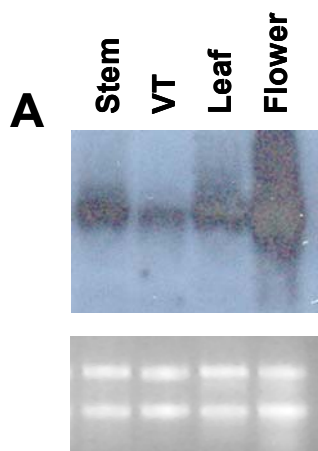
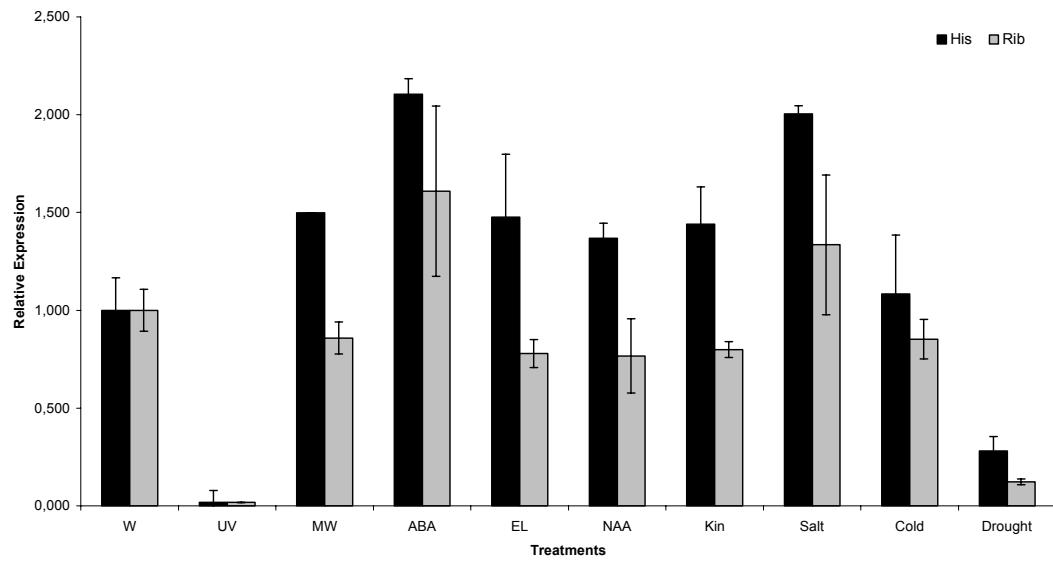




Fig. 6. Quantitative reverse transcription PCR analysis of *EgrSAMDC2* relative expression from total RNA isolated from *E. grandis* treated seedlings and amplified using a specific primer pair. Results are expressed as the relative quantification of *EgrSAMDC2* amplification products against the independent internal controls Histone H2B (His) or ribonucleoprotein L23A (Rib). Treatments of seedlings included distilled water (W); ultraviolet light (UV); mechanical wounding (MW); abscisic acid (ABA); yeast extract (EL, elicitor); 1-naphthaleneacetic acid (NAA); kinetin (Kin); sodium chloride (salt); cold and drought.



## **CAPÍTULO IV**

Cloning and characterization of a *Eucalyptus* cDNA encoding a mitogen-activated protein kinase (MAPK)

(Trabalho a ser submetido à revista *GENE – Section Functional Genomics*)

Cloning and characterization of a *Eucalyptus* cDNA encoding a mitogen-activated protein kinase (MAPK)

Ana Paula Körbes<sup>1</sup>, Rogério Margis<sup>2</sup>, Maria Helena Bodanese-Zanettini<sup>1</sup>, Giancarlo Pasquali<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil; <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Abbreviations:* MAPK, Mitogen-activated protein kinase; EST, expressed sequence tag; ORF, open reading frame; qRT-PCR, quantitative reverse transcription PCR.

\* Corresponding author. C.P. 15.005, CEP 91501-970. Tel.: 51 3316 9410. E-mail address: pasquali@cbiot.ufrgs.br

## **Abstract**

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades play important roles in signal transduction of extracellular stimuli to intracellular targets in all eukariotic organisms. In plants, there is evidence that MAPKs are involved in the signalling of abiotic stresses, pathogens, plant hormones, and cell cycle cues. Many plant MAPKs have been characterized up to now. However, as most efforts are focused on model plants, nothing is known about these genes in economically important tree species. In this study, a full-length cDNA (*EgrMAPK2*) from *Eucalyptus grandis* that showed homology to plant stress-responsive MAPKs was isolated and characterized. The *EgrMAPK2* cDNA sequence contained a complete coding region for the peptide but was interrupted by two introns with conserved splicing sites, revealing that the isolated cDNA was derived from an immature mRNA sequence or from an alternative splicing product. According to our phylogenetic analysis with the deduced protein of this single copy gene, *EgrMAPK2* belongs to subgroup A2 of plant MAPKs, which is frequently associated with various biotic and abiotic stress responses. *EgrMAPK2* transcripts were significantly induced in seedlings exposed to kinetin and high salinity, but also weakly induced with ABA. UV treatment drastically reduced *EgrMAPK2* gene expression. These results suggest that *EgrMAPK2* might be related to signaling of both cell division and stress responses.

**Keywords:** *Eucalyptus grandis*, MAPK cascades, gene expression, stress tolerance, gene copy number

## 1. Introduction

Plants are frequently exposed to unfavorable environmental stresses such as drought, extreme temperature, wounding and pathogen infection. To withstand these different stimuli, plants must sense the signals and respond to them, which influence their growth and development. Progress in understanding signal transduction showed that protein phosphorylation plays a pivotal role in response to extracellular signals, as a surprisingly large number of genes encoding mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway components have been described from plant genomes (Nakagami et al., 2005). Plant MAPK cascades are associated with defense responses to pathogens, cellular responses to hormones, regulation of the cell cycle, and responses to abiotic stresses (for review, Jonak et al., 2002).

MAPKs are a family of conserved serine/threonine protein kinases that have been adapted throughout evolution to form parts of diverse signal transduction pathways in all eukaryotes (Kültz and Burg, 1998). In general, each MAPK cascade consists of at least three protein kinases, which mediate sequential phosphorylation reactions, as follows: a MAPK kinase kinase (MAPKKK) phosphorylates and activates a MAPK kinase (MAPKK) which, in turn, activates a MAPK by phosphorylation of both tyrosine and threonine residues in the TXY motif (Widmann et al., 1999; Chen et al., 2001).

MAPKs are promiscuous serine/threonine kinases that phosphorylate a variety of substrates, including transcription factors, protein kinases and cytoskeletal proteins. The specificity of MAPK cascades functioning within the same cell is generated through the presence of docking domains that are found in various components of the MAPK modules and also through scaffold proteins (Tanoue et al., 2000; Biondi and Nebreda, 2003). The biological processes in which MAPKs are involved are best understood in yeast and mammals and, therefore, these organisms can be viewed as models for understanding the role of MAPK cascades in plant systems (Pearson et al., 2001; Roux and Blenis, 2004). For example, in mammalian cells, Extracellular-signal-regulated Kinases (ERKs) have been shown to be involved in signaling hormones, neurotransmitters and signals for differentiation (Marshall, 1994), while JNK1 and p38 MAPKs are activated in response to environmental stresses (Kyriakis et al., 1994; Ono and Han, 2000). Research on many plant MAPKs suggests that

MAPK cascades have a wider variety of roles in plants than those in animals and yeast (Mizoguchi et al., 1997).

In plants, a variety of genes encoding MAPKs have been identified. More than 20 cDNAs encoding putative MAPKs have been cloned from different species such as *Arabidopsis* (Mizoguchi et al., 1993), tobacco (Wilson et al., 1993), alfalfa (Duerr et al., 1993), pea (Stafstrom et al., 1993) and petunia (Decroocq-Ferrant et al., 1995). However, the complete information available about the *Arabidopsis* genome makes this species a blueprint for assessing the complexity of other plant genomes. In a recent analysis, 20 MAPKs, 10 MAPKKs and 60 MAPKKKs were identified in the *Arabidopsis* genome, and a unified nomenclature for *Arabidopsis* MAPKs and MAPKKs has been proposed (Ichimura et al., 2002). It is not possible to unequivocally define homologues across species, and therefore the *Arabidopsis* nomenclature cannot be adapted to other species. Nevertheless, the comparative sequence similarity of *Arabidopsis* and other plant MAPKs indicates that there are four distinct subfamilies (A-D, Ichimura et al., 2002), which can be used as a reference to relate plant MAPK components across species. Subfamilies A-C have a TEY phosphorylation motif in their active site, whereas subfamily D have a TDY motif at the corresponding position. Moreover, it is suggested that MAPKs from group A are involved in environmental and hormonal responses, while group B, although less studied, is involved in both environmental stress responses and cell division. Information on group C and D is limited, but has been related to circadian-rhythm and fungus and wounding induction, respectively (for review, Ichimura et al., 2002).

Despite the large number of MAPKs isolated from plants, there have been no reports for any MAPK gene isolated from tree species. In this study, we isolated and characterized an immature (intron-containing) cDNA from *Eucalyptus grandis* potentially encoding a full-length and active MAPK, and named *EgrMAPK2*. In order to contribute to the knowledge of MAPK genes in trees, we characterized the genomic organization and the expression pattern of *EgrMAPK2* in *E. grandis* seedlings challenged by different treatments.

## **2. Material and Methods:**

## 2.1 cDNA Library construction and sequencing

Seeds of *E. grandis* (supplied by Aracruz Cellulose S.A., Guaíba, RS, Brazil) were surface sterilized by sequentially soaking in 70% ethanol for 2 min, 1% (v/v) active chlorine solution for 15 min and five times in sterilized water. Seeds were then placed in culture flasks (5 cm in diameter, 8 cm high) containing the Murashige & Skoog (MS, Invitrogen) complete medium solidified by 0.7% (w/v) Phytoagar (Duchefa) and left to germinate in the dark for two days at 26±2 °C. After germination, flasks were transferred to a culture room with a 16 h photoperiod at the same temperature. Total RNA was extracted from 60-days old *E. grandis* seedlings using Concert Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions for multi RNA minipreps. Messenger RNA was extracted by the employment of the Oligotex mRNA Purification System (Qiagen). A total amount of 5 µg mRNA was finally used for cDNA library construction by the Superscript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning Kit (Invitrogen).

Plasmid DNA preparation was carried out in 96-well microplates using standard methods based on alkaline lysis and filtration in Millipore filter plates. Plasmid samples were sequenced using the automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armed with 50 cm capillaries and POP6 polymer (Applied Biosystems). DNA templates (30 to 45 ng) were labeled with 3.2 pmol of primer GlyptsRev1 (5'-ATAGGGAAAGCTGGTACGC-3') or M13 -40 forward (5'-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA-3', Amersham Biosciences) and 2 µL of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) in a final volume of 10 µL. Labeling reactions were performed in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) thermocycler with a initial denaturing step of 96 °C for 3 min followed by 25 cycles of 96 °C for 10 sec, 55 °C for 5 sec and 60 °C for 4 min. Labeled samples were purified by isopropanol precipitation followed by 70% ethanol rinsing. Precipitated products were suspended in 10 µL formamide, denatured at 95 °C for 5 min, ice-cooled for 5 min and electroinjected in the automatic sequencer. Sequencing data were collected using the software Data Collection v1.0.1 (Applied Biosystems) Data generated were processed by a suite of programs available at the Universidade Católica de Brasília (<http://www.ucb.br/genolyptus>)



prior to assembly with the PHRED (Ewing and Green 1998; Ewing et al. 1998) and PHRAP (<http://phrap.org/>) algorithms. Accepted ESTs were selected based on a minimal length of 250 bp with every base having a quality of PHRED higher than 20.

Multiple fragments of the *EgrMAPK2* cDNA cloned into pSport1 (Invitrogen) were generated using internal restriction enzymes and subcloned into SK<sup>+</sup> pBluescript (Stratagene) to allow full sequencing. Internal primers were also designed (G1for, 5'-CACGAGGGATTTGCTCAATT-3'; G1rev, 5'-AGTGACCTGCATGAACCTCC -3'; G2for, 5'-GGGATTGGGACATGAAATTG-3'; G2rev, 5'-AAAAGAGCAGCCAAGGATCA-3'; G3rev, 5'-CTGACAAAACGCTGCAAGAA-3') and, along with universal SK<sup>+</sup> primers, employed to complete sequencing of the insert.

## 2.2 Southern blot hybridization analysis

Genomic DNA was extracted from young *E. grandis* leaves by the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) procedure described by Doyle and Doyle (1987). Twenty µg of genomic DNA were digested with *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *BamHI*, *SalI* and *PstI* and fractionated by electrophoresis on a 0.8% agarose gel.

DNA fragments were transferred to Hybond N<sup>+</sup> membranes (Amersham Biosciences). Transfer, hybridization and detection were performed using the Gene Images Random Prime Labelling and Gene Images CDP-Star Detection Modules (Amersham Biosciences) following the manufacturer's instructions. The 1,555 bp *XbaI*/*HindIII* fragment of the *EgrSAMDC2* cDNA was used as probe.

## 2.3 Plant material and treatments for quantitative reverse transcription PCR analysis

Culture flasks containing 3 to 4 *E. grandis* seedlings grown *in vitro* for 4 months as described above were submitted to several treatments in duplicate. Treatments consisted of 3 identical sprays into the flasks of the following: distilled water (control); 0.2 mg/l kinetin; 2 mg/l 1-naphthaleneacetic acid; 0.5 mM abscisic acid; 1.5% yeast extract dissolved in water; 3 min exposure to direct ultraviolet light (254 nm, 2 to 5 cm distance) followed by water sprays;

and 0.5 M sodium chloride. Drought treatment consisted in leaving the flasks opened overnight in the culture room. Mechanical wounding was performed by clenching leaves and stems with a flat forceps followed by water sprays and overnight incubation. Cold treatment consisted in leaving flasks during 3 days at 4 °C followed by water spray and overnight at the culture room. After the simultaneous overnight incubations, all seedlings were harvested and immediately frozen and stored in liquid nitrogen.

Total RNA from *in vitro* grown *E. grandis* seedlings was isolated after the described treatments using the Concert Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions for multi RNA minipreps.

#### 2.4 Quantitative reverse transcription PCR

Total RNA isolated from *E. grandis* seedlings was treated with DNase I at 37 °C for 30 min prior to use. One µg of total RNA was added to each cDNA synthesis reaction using the Superscript II RT pre-amplification system (Invitrogen). Reactions were performed at 42 °C for 1 h using the primer 3' Smart CDS IIA (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT<sub>30</sub>VN-3'). PCR amplification was carried out using specific primer pairs designed with the employment of the GenScript Corporation's Real-Time PCR Primer Design tool ([www.genscript.com/ssl-bin/app/primer](http://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer)). Primers were synthesized by Integrated DNA Technologies Inc.

Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) was carried out in an Applied Biosystem 7500 real-time cycler. Reaction settings were composed of an initial denaturation step of 5 min at 94 °C followed by 45 cycles of 10 s at 94 °C, 15 s at 63 °C, and 15 s at 72 °C; samples were kept for 2 min at 40 °C for reannealing and then heated from 55 to 99 °C with a ramp of 0.1 °C/s to acquire data to produce the denaturing curve of the amplified products. qRT-PCRs were performed in 20 µl final volume composed of 10 µl of each reverse transcription sample diluted 50 times in 2 µl Platinum Taq 10x PCR buffer (Invitrogen), 1.2 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.4 µl dNTPs 5 mM, 0.4 µl primer pairs at 10 µM, 4.95 µl ultra pure water, 1.0 µl SYBR green (1:100,000, Molecular Probes), and 0.05 µl Platinum Taq DNA polymerase (5 U/µl, Invitrogen). The melting temperatures of all primers were adjusted to 60 °C. qRT-PCR

*EgrMAPK2* primers were 5'- GATAACAAGATCGACGCGAA-3' (MAPK-RT-for) and 5'- TCTGTGGCGGTGGAATAATA-3' (MAPK-RT-rev, product size of 106 bp). Histone H2B and ribonucleoprotein L23A gene sequences were used as internal controls to normalize the amount of mRNA present in each sample. qRT-PCR primers of the control genes employed were 5'-GAGCGTGGAGACGTACAAGA-3' (HistoneH2B-RT-for), 5'- GGCGAGTTTCTCGAAGATGT-3' (HistoneH2B-RT-rev, product size of 127 bp), 5'- AAGGACCCTGAAGAAGGACA-3' (RibPtnL23A-RT-for), 5'- CCTCAATCTTCTTCATCGCA-3' (RibPtnL23A-RT-rev, product size of 128 bp).

All results were expressed as a relative quantification of the specific *MAPK* gene amplification products and the Histone H2B or the ribonucleoprotein L23A internal control genes using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method described by Livak and Schmittgen (2001). Three internal replications per experiment were performed.

## 2.6 Bioinformatic analysis

Clustered DNA sequences of the GENOLYPTUS project database, derived from expressed sequence tags (ESTs) obtained from cDNAs generated from different tissues, organs or growth conditions, were the primary data source for this work. A putative full-length MAPK cDNA was identified and BLASTp and BLASTn programs (Altschul et al., 1997), available at The National Center for Biotechnology Information (NCBI) homepage (<http://www.ncbi.nih.gov>), were used to confirm the identity of the EST in the gene and protein databases. DNA and protein sequence alignments were carried using ClustalW (Higgins et al., 1994) with default parameters and edited using GeneDoc program Version 2.6.002 (Nicholas et al., 1997; <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>). Phylogenetic analysis was performed with the Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) package Version 3.1 (Kumar et al., 2004), according to the parameter of p-distance, pairwise deletion and with the Neighbor-Joining method. Confidence of tree topology was calculated by bootstrap after 2000 replications.

### 3. Results

#### 3.1 Isolation and characterization of a *E. grandis* MAPK complete cDNA

As part of the GENOLYPTUS Project: The Brazilian Research Network on the *Eucalyptus* Genome ([www.ucb.br/genolyptus](http://www.ucb.br/genolyptus)), our group screened for expressed sequence tags (ESTs) related to MAPK among 120,000 ESTs available. A total number of 3 clusters and 12 singlets with deduced protein homology to MAPKs were identified in the GENOLYPTUS database, all derived from *E. grandis*. Among these ESTs, one putative full-length clone was identified due to the presence of the ATG translational start codon aligned to other known plant MAPK sequences (result not shown; see next, Fig. 1) and due to the homology with stress related MAPKs. This cDNA sequence was named *EgrMAPK2* and submitted to the GenBank under the accession number \_\_\_\_\_ (to be defined).

The selected clone, *EgrMAPK2*, presents a total of 4,975 bp in length. The entire sequencing of the cDNA and comparisons with available plant homologue sequences revealed the presence of two introns interrupting the open reading frames (ORFs), starting at the positions 922 and 1410 of the complete sequence. The two introns are 307 and 3,215 bp in length, respectively. The canonical 5'- and 3'-splice sites could be found in the border junctions of introns and coding sequences (not shown; Sun and Chasin, 2000; Fu, 2004). The sequence also presented an untranslated 5' region of 75 bp and a 3' region of 118 bp, including a poly(A)-tail. Due to all these features, the selected clone represents a full-encoding cDNA, but produced from either an immature mRNA form or an alternatively spliced mRNA.

The presence of the characteristic splicing sites allowed us to join the three presumed exons of 846 bp, 181 bp and 173 bp, in this order. The fusion of these sequences established a complete ORF of 1,2 kb, which encodes a full peptide of 399 amino acids. As shown in Fig. 1, the deduced amino acid sequence contains 11 subdomains that are conserved among all MAPK families and possesses a dual phosphorylation activation motif (TEY) located between subdomains VII and VIII (Hirt, 1997). Therefore, *EgrMAPK2* potentially encodes an active MAPK.

The EgrMAPK2 protein shares high amino acid identities to other plant MAPK sequences including those described for *Glycine max* (GmMAPK2, 91% identity, GenBank accession number AF329506), *Medicago sativa* (MsMSK7, 89%, X66469), *Capsicum annuum* (CaMK2, 89%, AF247136), *Nicotiana tabacum* (NtSIPK, 88%, U94192) and *Arabidopsis thaliana* (AtMPK6, 87% identity, D21842). Phylogenetic analysis based on the alignment of MAPKs deduced amino acid sequences of representative members of each subgroup of the plant MAPK family proposed by Ichimura et al. (2002) suggests that EgrMAPK2 belongs to the A2 subgroup (Fig. 2). Previous studies indicated that members of the A1 and A2 subgroups are frequently activated by various biotic and abiotic stresses (Zhang and Klessig, 2001).

### 3.2 Gene-copy number of *Eucalyptus* MAPK2

To estimate the number of *EgrMAPK2*-like genes into the *E. grandis* genome, Southern blot analysis was carried out. Genomic DNA was digested with *EcoRI*, *HindIII*, *EcoRV*, *BamHI*, *SalI* and *PstI* restriction enzymes, which did not cut the *EgrMAPK2* cDNA in the probe homologue region. As shown in Fig. 3, a strong hybridization signal was observed in all lanes when the 1.5 kb fragment of the *EgrMAPK2* cDNA was used as probe. As the probe sequence comprises part of both introns and the exon between them, this pattern indicates that there is probably one single gene of *EgrMAPK2* into the *E. grandis* genome, which is consistent with the results from other reported studies (Fu et al., 2002; Xiong and Yang, 2003).

### 3.3 *EgrMAPK2* gene expression in *E. grandis* seedlings treated by different stimuli

To determine the pattern of *EgrMAPK2* mRNA accumulation under different *E. grandis* growth conditions, specific primers for *EgrMAPK2* were designed and used in qRT-PCR analysis. Total RNA was isolated from 4-months old *in vitro* seedlings subjected to various environmental stresses and plant growth regulators. The expression of the *EgrMAPK2* gene was normalized against the expression of the putative genes encoding histone H2B and the

ribonucleoprotein L23A. As shown in Fig. 4, expression of *EgrMAPK2* was drastically reduced only after UV treatment of the seedlings. Kinetin and salt significantly induced *EgrMAPK2* expression, while ABA only weakly induced the transcription. All other treatments did not significantly affect the expression of the *EgrMAPK2* gene. These results suggest that *EgrMAPK2* might be related to signaling of both cell division and stress response to salinity.

#### 4. Discussion

In the present study we have identified and characterized a full-length cDNA, *EgrMAPK2*, among 20 MAPK-homologue sequences available at the GENOLYPTUS transcriptome project database. Considering that cDNA first strands were synthesized by the employment of a primer complementary to mRNA poly(A)-tails, most of the generated products might keep the 3'-terminal region of the genes. The surprisingly large size of the clone, almost 5 kb in length, was proven to be due to the presence of two intronic sequences. The borders of these presumed introns are flanked by canonical structures previously described (Sun and Chasin, 2001; Fu, 2004). As affirmed by Sun and Chasin (2001), an exon is immediately preceded by the AG dinucleotide and immediately followed by the GU dinucleotide. These authors also pointed out that real exons are recognized and spliced cotranscriptionally, with a half-time of about 5 min *in vivo*, and that the pseudosites are efficiently ignored during this process. It is well-known that alternative splicing of heterogeneous nuclear RNA is an important mechanism of gene expression and regulation (Lopez, 1998). This mechanism is not a novelty for MAPKs and are best characterized in human and mouse (Krupa and Srinivasan, 2002; Caenepeel, 2004). More recent analysis identified in the human genome about 500 genes encoding members of the kinase family, and although many of them were well known genes, a larger number of genes coded for unknown proteins identified as kinase only after computational studies (Milanesi et al., 2005). After a systematic *in silico* analysis, Milanesi et al (2005) identified only 5 genes and 1 pseudogene, indicating that a large number of kinase DNA sequences may code for alternately spliced

forms or were incorrectly annotated. Although less detailed, alternative splicing has also been described for some plant MAPKs such as the MAPKKK gene *ANP1* (Nishihama et al., 1997). Xiong and Yang (2003) isolated two cDNAs from *Oryza sativa* named OsMAPK5, one encoding a complete MAPK protein and another lacking the subdomains III to VI, which determines the loss of its kinase activity. The authors did not explore the significance of this inactive isoform. Whether the finding of the incompletely spliced MAPK form described here is related to alternative splicing or to a translational regulation mechanism remains to be explained. Despite of that, it is reasonable to admit that the isolated *EgrMAPK2* potentially encodes a full-length and functional protein due to the presence of the canonical splicing sites, the presence of all functionally important features in the deduced protein and its high homology to other plant MAPKs from the related subgroup. Functional analysis may confirm this hypothesis.

Considering the importance of MAPKs in various aspects of plant growth and development, as well as defense/stress responses, and the increasing number of identified MAPKs from plants, a systematic nomenclature for *Arabidopsis* MAPKs was proposed mainly on the basis of their structural features (Ichimura et al., 2002). Since the idea was that this simplified nomenclature could serve as a basis for standard annotations of MAPKs in other plant species, one can assume the putative function(s) of uncharacterized MAPKs. Our phylogenetic analysis grouped the *EgrMAPK2* deduced protein along with other MAPKs from subgroup A2. Most known members of the MAPK family belong to subgroups A and B (Ichimura et al., 2002). It is suggested that MAPKs from group A are frequently involved in environmental and hormonal responses. Expression pattern studies with some members of this subgroup, such as those from *A. thaliana* MPK3 and MPK6, tobacco SIPK and rice MAPK5a, supported such assumption (Zhang and Klessig, 2001; Xiong and Yang, 2003).

In order to better understand the function of *EgrMAPK2* in response to different stimuli, 4-months old *in vitro* seedlings were exposed to biotic and abiotic-like stresses, as well as hormone-like signals. Preliminary qRT-PCR experiments demonstrated that *EgrMAPK2* might be related to signaling of both cell division and stress responses. This result is expected, as *EgrMAPK2* is an A2 MAPK homologue. Nevertheless, before taking these results as definitive conclusions, it will be important to repeat qRT-PCR experiments in more detail, with

biological duplicates and time-courses, since only one assay was performed and in one time lapse (16 h) after treatments.

Although there is much progress in the knowledge of plant MAPKs, many questions remain to be answered. The complexity of MAPK signaling in plants involves the redundancy of signaling components, antagonism among distinct pathways and both positive and negative regulatory mechanisms (Tena et al., 2001). Consequently, a thorough understanding of each plant MAPK signaling cascade will require further systematic analysis of new plant genes and the employment of diverse functional and genetic analysis methods. In this work, we described a member of the MAPK family in *Eucalyptus*, the *EgrMAPK2*, the first reported MAPK-encoding sequence from a tree species as far as we are acknowledged. In order to further help understanding the function of such genes in plants, we generated *EgrMAPK2* transgenic tobacco plants that are currently under evaluation.

## **Acknowledgments**

Authors would like to thank M.Sc Norton Borges Jr., João Bauer and colleagues (Aracruz Celulose e Papel S.A.) for the donation of *E. grandis* seeds and for their help in collecting plant material from field grown trees; Dr. Arthur G. Fett Neto and M.Sc. Joséli Schwambach (UFRGS) for culture room facilities and for yielding *E. grandis in vitro* grown plants; M.Sc. Felipe Fenselau de Felippes (UFRGS) for his help with Southern and Northern blot experiments. This work was supported by The Brazilian Ministry of Science and Technology (MCT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCT) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/MEC) which granted a M.Sc. scholarship to A.P. Körbes. Finally, we are most grateful to all researchers from private and public institutions that are part of the GENOLYPTUS Project.



## References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped-Blast and Psi-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Biondi, R.M., Nebreda, A.R., 2003. Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem. J.* 372, 1-13.
- Caenepeel, S., Charydczak, G., Sudarsanam, S., Hunter, T., Manning, G., 2004. The mouse kinome: Discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases. *PNAS* 101, 11707-11712.
- Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., Cobb, M.H., 2001. MAP kinases. *Chem. Rev.* 101, 2449-2476.
- Decroocq-Ferrant, V., Decroocq, S., van Went, J., Schmidt, E., Kreis M., 1995. A homolog of the MAP/ERK family of protein kinase gene is expressed in vegetative and in female reproductive organs of *Petunia hybrida*. *Plant Mol. Biol.* 27, 339-350.
- Doyle, J., Doyle, L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15.
- Duerr, B., Gawienowski, M., Ropp, T., Jacobs, T., 1993. MsERK1: a mitogen-activated protein kinase from a flowering plant. *Plant Cell* 5, 87-96.
- Ewing, B., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred, II: Error probabilities. *Genome Res.* 8, 186-194.

- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred, I: Accuracy assessment. *Genome Res.* 8, 175-185.
- Fu, S.-F., Chou, W.-C., Huang, D.-D., Huang, H.-J., 2002. Transcriptional regulation of a rice mitogen-activated protein kinase gene, OsMAPK4, in response to environmental stresses. *Plant Cell Physiol.* 43, 958-963.
- Fu, X.-D., 2004. Towards a Splicing Code. *Cell* 119, 736-738.
- Hirt, H., 1997. Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends Plant Sci.* 2, 11-15.
- Ichimura et al., 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature. *Trends Plant Sci.* 7, 301-308.
- Jonak, C., Ökrész, L., Bögre, L., Hirt, H., 2002. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 415-424.
- Krupa A., Srinivasan, N., 2002. The repertoire of protein kinases encoded in the draft version of the human genome: atypical variations and uncommon domain combinations. *Genome Biol.* 3(12), RESEARCH0066.
- Kültz, D., Burg, M., 1998. Evolution of osmotic stress signaling via map kinase cascades. *J. Exp. Biol.* 201, 3015-3021.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment Briefings in Bioinformatics 5, 150-163.

- Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J. and Woodgett, J.R., 1994. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-160.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Methods* 25, 402-408.
- Lopez, A.J., 1998. Alternative splicing of pre-mRNA: Developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu. Rev. Genet.* 32, 279-305.
- Marshall, C.J., 1994. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 82-89.
- Milanesi et al., 2005. Systematic analysis of human kinase genes: a large number of genes and alternative splicing events result in functional and structural diversity. *BMC Bioinformatics* 6, S20.
- Mizoguchi, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Kamada, H., Shinozaki, K., 1993. ATMPKs: a gene family of plant MAP kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 336, 440-444.
- Mizoguchi, T., Irie, K., Shinozaki, K., 1997. Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinase. *Trends Biotechnol.* 15, 15-19.
- Nakagami, H., Pitzschke, A., Hirt, H., 2005. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. *Trends Plant Sci.* 10, 339-346.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B., Deerfield, D.W., 1997. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW.NEWS* 4, 14.

- Nishihama, R., Banno, H., Kawahara, E., Irie, K., Machida, Y., 1997. Possible involvement of differential splicing in regulation of the activity of Arabidopsis ANP1 that is related to mitogen-activated protein kinase kinase kinases (MAPKKKs). *Plant J.* 12, 39-48.
- Ono, K., and J. Han., 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal.* 12, 1-13.
- Pearson, G., Robinson, F., Gibson, B.T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H., 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrinol. Rev.* 22, 153-183.
- Roux, P.P., Blenis, J., 2004. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 68, 320-344.
- Stafstrom, J.P., Altschuler, M., Anderson, D.H., 1993. Molecular cloning and expression of a MAP kinase homologue from pea. *Plant Mol. Biol.* 22, 83-90.
- Sun, H., Chasin, L.A., 2000. Multiple splicing defects in an intronic false exon. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6414-6425.
- Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., Nishida, E., 2000. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat. Cell Biol.* 2, 110-116.
- Tena, G., Asai, T., Chiu, W.L., Sheen, J. 2001. Plant mitogen activated protein kinase signaling cascades. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 392-400.
- Widmann, C., Gibson S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L., 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79, 143-180.

Wilson, C., Eller, N., Gartner, A., Vicente, O., Heberle-Bors, E., 1993. Isolation and characterization of a tobacco cDNA clone encoding a putative MAP kinase. *Plant Mol. Biol.* 23, 543-55.

Xiong, L., Yang, Y., 2003. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 15, 745-759.

Zhang, S., and Klessig, D.F., 2001. MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* 6, 520-527.

Fig. 1. Alignment of deduced amino acid sequences of EgrMAPK2 with those of three closely related MAPKs from *Glycine max* (GmMAPK2, accession number AF329506), *Capsicum annuum* (CaMK2, AF247136), and *Arabidopsis thaliana* (AtMPK6, D21842). The 11 subdomains are indicated above the sequence with Roman numerals and the dual phosphorylation activation motif (TEY) is indicated by arrow.

EgrMAPK2 : MDGG-APQPADTVMSEAAAPAQQQQQQQQQFQQAQPGIENIPATLSHGGRFIQYNI FGNIFEVTAKYKPP : 69  
 GmMAPK2 : MEGGGAAPPADTVMSDAAPP-----EQQAMAMGIENIPATLSHGGRFIQYNI FGNIFEVTAKYKPP : 61  
 CaMK2 : MDG--PAQQTDTVMAEAAAAQQPAP----FSQPVA-GIDNIPATLSHGGRFIQYNI FGNIFEVTAKYKPP : 63  
 AtMPK6 : MDGSGQPAADTEMTA-PGGFPA---ESPQMP-GIENIPATLSHGGRFIQYNI FGNIFEVTAKYKPP : 65

..... I ..... II ..... III ..... IV .....  
 EgrMAPK2 : IMPIGKAYGIVCSALNSETNEHVAIKKIANAFDNKIDAKRTLREIKLLRHMDHENVVAIRDII PPPQRE : 139  
 GmMAPK2 : IMPIGKAYGIVCSALNSETNEHVAIKKIANAFDNKIDAKRTLREIKLLRHMDHENVVAIRDIV PPPQRE : 131  
 CaMK2 : IMPIGKAYGIVCSALNSETNEHVATKKIANAFDNKIDAKRTLREIKLLRHMDHENIVVAIRDII PPPQRE : 133  
 AtMPK6 : IMPIGKAYGIVCSAMNSETNESVAIKKIANAFDNKIDAKRTLREIKLLRHMDHENIVVAIRDII PPPLRN : 135

..... V ..... VI .....  
 EgrMAPK2 : VFNDVYIAYELMDTDLHQIIRSNOALSEEHCQYFLYQILRGLKYIHSANVLHRDLKPSNLLLNANCDLKI : 209  
 GmMAPK2 : IFNDVYIAYELMDTDLHQIIRSNOGLSEEHCQYFLYQILRGLKYIHSANVLHRDLKPSNLLLNANCDLKI : 201  
 CaMK2 : AFNDVYIAYELMDTDLHQIIRSNOGLSEEHCQYFLYQILRGLKYIHSANVLHRDLKPSNLLLNANCDLKI : 203  
 AtMPK6 : AFNDVYIAYELMDTDLHQIIRSNOALSEEHCQYFLYQILRGLKYIHSANVLHRDLKPSNLLLNANCDLKI : 205

..... VII ..... VIII ..... IX .....  
 EgrMAPK2 : CDFGLARVTSETDFMTEYVVTRWYRAPELLLNSSDYTA AIDVW SVGCIFMELMDRKPLF PGRDHVQQLRL : 279  
 GmMAPK2 : CDFGLARVTSETDFMTEYVVTRWYRAPELLLNSSDYTA AIDVW SVGCIFMELMDRKPLF PGRDHVHQLRL : 271  
 CaMK2 : CDFGLARVTSETDFMTEYVVTRWYRPPPELLLNSSDYTA AIDVW SVGCIFMELMDRKPLF PGRDHVQQLRL : 273  
 AtMPK6 : CDFGLARVTSETDFMTEYVVTRWYRAPELLLNSSDYTA AIDVW SVGCIFMELMDRKPLF PGRDHVHQLRL : 275

..... X ..... IX .....  
 EgrMAPK2 : LMELIGTPSEAE LGFL-NENAKRYIRQLPLYRRQSFTEKFP HVHPLAIDLVEKMLTFDPRRLRTV E EALA : 348  
 GmMAPK2 : LMELIGTPSEAD LGFL-NENAKRYIRQLPLYRRQSFQEKFP HVHPEAIDLVEKMLTFDPRKRITV E DALA : 340  
 CaMK2 : LMELIGTPSEAE MEFL-NENAKRYIRQLPLYRRQSFVEKFP HVNPA AIDLVEKMLTFDPRRRLTV E DALA : 342  
 AtMPK6 : LMELIGTPSEEE LEFL-NENAKRYIRQLPEYPRQSITDKFPTVHPLAIDLIEKMLTFDPRRRLTV L DALA : 344

EgrMAPK2 : HPYLNSLHDISDEFTCMNPFNFDFEQHALTEEQMKELIYREALAFNPEYLQ- : 399  
 GmMAPK2 : HPYLNSLHDISDEPVCMTPFNDFEQHALTEEQMKELIYREALAFNPEYQQ- : 391  
 CaMK2 : HPYLNSLHDISDEPVCTTFFSDFEQHALTEEQMKELIYREGLA FNPEYQHM : 394  
 AtMPK6 : HPYLNSLHDISDEPECTIPFNDFENHALSEEQMKELIYREALAFNPEYQQ- : 395

Fig. 2. Phylogenetic relationship of EgrMAPK2 deduced protein with other plant MAPKs. The dendrogram was constructed using MEGA 3.1 software (p-distance with pairwise deletion; Neighbor-Joining method with bootstrap of 2000 replications) based on alignment of the deduced amino acid sequences of representative plant MAPKs from each subgroup of the MAPK family (proposed by Ichimura et al., 2002), including EgrMAPK2. The sequences used (and GenBank accession numbers) are from *A. thaliana* (D14713, D21839, D21840, D21841, D21842, D21843, AB038693, NM\_100662, NM\_126206, NM\_104229, NM\_129849), *C. annuum* (AF247136), *G. max* (AF329506), *Nicotiana tabacum* (D61377, U94192), *Oryza sativa* (AJ251330, AF479883), *Pisum sativum* (AF154329) and *Zea mays* (AB016802). MAPK-family subgroups are indicated by capital letters at the right. Bootstraps higher than 80% are indicated.



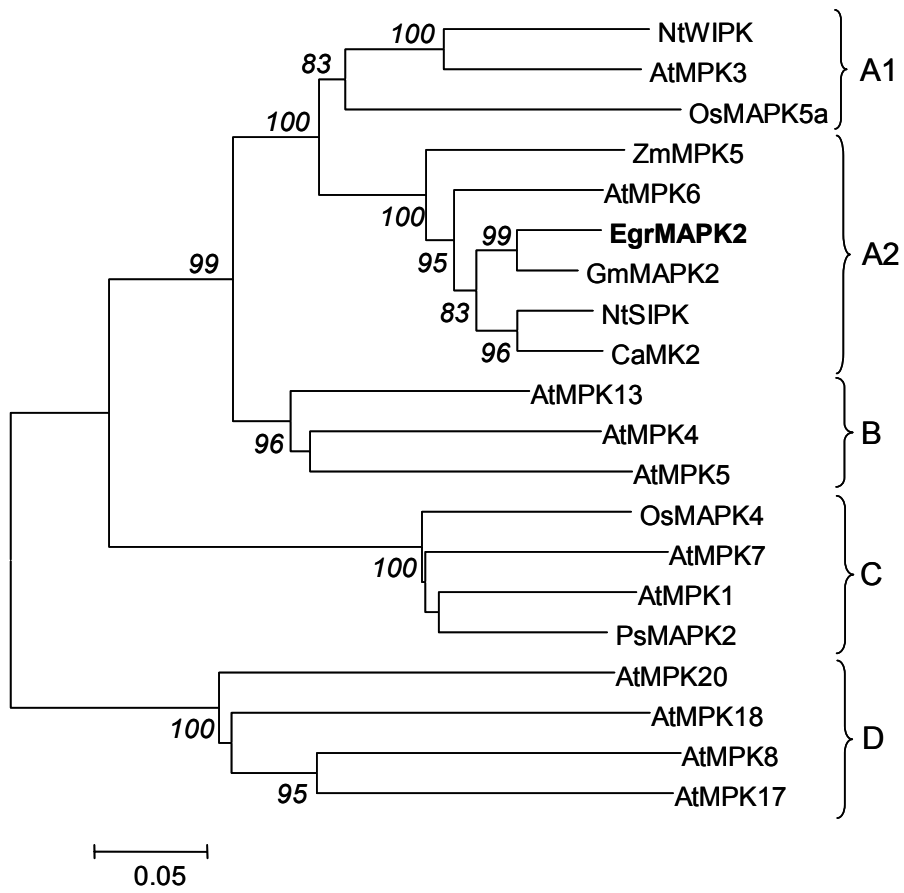


Fig. 3. DNA hybridization analysis of *MAPK2*-like genes in *E. grandis*. Ten micrograms of genomic DNA isolated from *E. grandis* seedlings were digested with *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *BamHI*, *Sall* or *PstI*, fractionated on a 0.8% agarose gel and, after electrophoresis, transferred to a nylon membrane and hybridized with a *EgrMAPK2* cDNA fragment (1.5 kb) probe. Relative DNA fragment lengths in kb are indicated in the left.

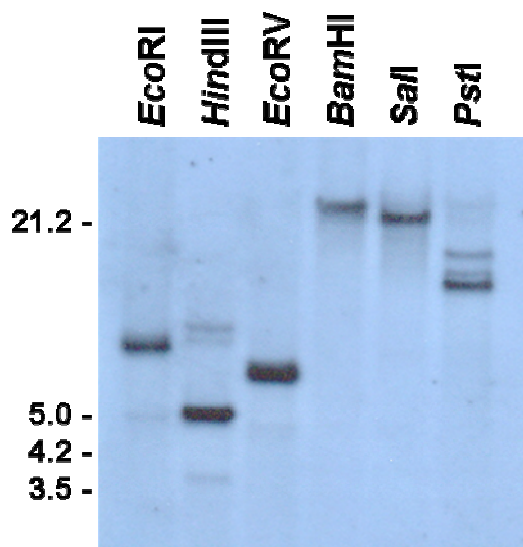
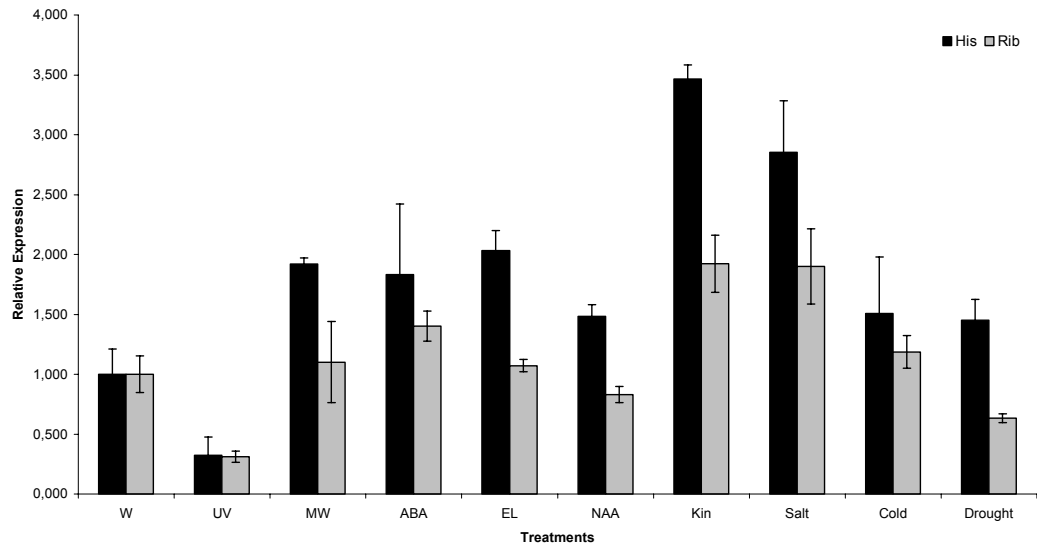


Fig. 4. Quantitative reverse transcription PCR analysis of *EgrMAPK2* relative expression from total RNA isolated from *E. grandis* treated seedlings and amplified using a specific primer pair. Results are expressed as the relative quantification of *EgrMAPK2* amplification products against the independent internal controls Histone H2B (His) or ribonucleoprotein L23A (Rib). Treatments of seedlings included distilled water (W); ultraviolet light (UV); mechanical wounding (MW); abscisic acid (ABA); yeast extract (EL, elicitor); 1-naphthaleneacetic acid (NAA); kinetin (Kin); sodium chloride (salt); cold and drought.



## V- DISCUSSÃO GERAL

A importância do setor agrícola na economia de países como o Brasil demanda constantes inovações para a superação de fatores limitantes de produtividade. Neste contexto, a tecnologia de transformação de plantas tem contribuído significativamente com ganhos e facilidades na produção e, conseqüentemente, nos lucros de agricultores e empresas de países que exploram plenamente tais tecnologias, como Estados Unidos da América, México, Argentina e China. Entretanto, fatores como seca e salinidade ainda representam consideráveis obstáculos à expansão das fronteiras agrícolas, além de determinar grandes perdas em regiões produtoras já estabelecidas, devido aos freqüentes períodos de estiagem. A geração de plantas transgênicas mais tolerantes às adversidades ambientais ainda depende da disponibilidade de genes que possam ser utilizados para esta finalidade.

O seqüenciamento completo do genoma de *Arabidopsis* abriu muitos caminhos para importantes descobertas sobre o funcionamento de genes envolvidos em várias funções fisiológicas das células. Com estas descobertas, alguns genes-chave de rotas de resposta a estresses bióticos e abióticos já foram patenteados e estão sendo utilizados para gerar plantas transgênicas com esta finalidade. Entre os vários trabalhos que estão sendo realizados com diferentes genes, como apresentado no Capítulo 2, poucos produtos já foram encaminhados para testes a campo. Assim, a descrição de genes que possam ser utilizados no desenvolvimento de cultivares de plantas economicamente importantes, como a soja, ainda é muito importante.

Projetos que exploram o transcriptoma de diferentes espécies vegetais como o GENOLYPTUS, para diferentes espécies de *Eucalyptus*, aumentam as possibilidades de exploração de genes já descritos e que também podem ser patenteados e utilizados para

experimentos de transgenia, gerando produtos biotecnológicos de propriedade nacional. O LBMV/CBiot/UFRGS, por fazer parte do projeto GENOLYPTUS, possui amplo acesso à base de dados de ESTs gerados a partir do seqüenciamento de bibliotecas de cDNA, construídas a partir de RNA de diferentes tecidos e órgãos de plantas adultas de eucalipto e, também, de plântulas cultivadas *in vitro* e submetidas a diferentes condições de crescimento. Desta forma, a exploração destes dados, visando genes específicos, é bastante facilitada, já que milhares de seqüências gênicas e seus respectivos clones estão disponíveis aos grupos participantes do Projeto.

No presente trabalho, uma ampla revisão bibliográfica foi apresentada no Capítulo 2, visando direcionar a busca por genes candidatos em eucalipto que apresentassem potencial em conferir tolerância à seca. Após o extenso levantamento, alguns genes mais freqüentemente testados em plantas transgênicas para conferência de fenótipos mais tolerantes a diferentes estresses foram escolhidos, e suas disponibilidades verificadas no banco de dados do Projeto GENOLYPTUS. Alguns clones de cada tipo foram selecionados e comparados às seqüências disponíveis no NCBI para a avaliação da integridade dos mesmos, sendo então classificados como potencialmente completos, como resumido no Anexo 1. Devido a este critério e à imediata disponibilidade das seqüências, alguns clones foram resgatados e re-seqüenciados em ambas as direções. Destes, dois foram estudados mais detalhadamente, como relatado nos Capítulos 3 e 4.

Os estudos de ambos os conjuntos de cDNAs basearam-se em abordagens semelhantes, iniciando pela obtenção das seqüências completas. Enquanto o clone de *EgrSAMDC2* apresentou em torno de 1,7 kb, o clone de *EgrMAPK2* selecionado foi surpreendentemente maior, com cerca de 5 kb. Por esta razão, o seqüenciamento completo deste último consumiu mais tempo e exigiu a geração de vários subfragmentos, que foram subclonados em um vetor de clonagem simples, o SK<sup>+</sup> pBluescript (Stratagene), com seqüências para oligonucleotídeos universais. A partir das seqüências completas, as principais conclusões que puderam ser deduzidas, em linhas gerais, foram:

- I- a seqüência de aminoácidos codificada por cada um dos genes;
- II- as características de cada proteína e sua relação com as funções esperadas;
- III- o número de cópias genômicas relacionadas com cada gene;

IV- o padrão de expressão em diferentes tecidos e órgãos e/ou em diferentes condições de crescimento.

No Capítulo 3, foram descritos os resultados obtidos a partir da identificação de dois cDNAs com alta homologia à SAMDC, *EgrSAMDC1* e *EgrSAMDC2*, que codificam uma enzima-chave da síntese de poliaminas. Para o seqüenciamento completo do cDNA de *EgrSAMDC2*, além dos oligonucleotídeos universais necessários para o seqüenciamento a partir das extremidades e de um fragmento subclonado, foi utilizado um oligonucleotídeo interno especificamente desenhado para *SAMDC*. Os fragmentos seqüenciados, utilizados na montagem final de *EgrSAMDC2*, encontram-se esquematicamente representados no Anexo 2. A seqüência completa de *EgrSAMDC1* foi obtida a partir da seqüência consenso de vários clones da biblioteca, embora um clone potencialmente completo tenha sido identificado e deverá ser posteriormente seqüenciado integralmente. A partir da seqüência completa de ambos, que se encontram nos Anexos 3 e 4, foi possível identificar a presença de duas regiões codificadoras, cujas seqüências de aminoácidos deduzidas apresentaram várias regiões conservadas em relação a outras *SAMDCs*. Em *SAMDC*, a seqüência codificadora principal (ORF) inicialmente representa uma proenzima, que é clivada em regiões específicas para constituir as subunidades funcionais  $\alpha$  e  $\beta$  (Schröder e Schröder, 1995). Tanto em *EgrSAMDC1* como em *EgrSAMDC2* foi identificado o domínio LSESSLF, relacionado com este processamento da proenzima (Xiong *et al.*, 1997). Além disso, o domínio TIHVTPEDGFSYASFE, denominado de PEST, também foi localizado. Este domínio, que geralmente determina meias-vidas menores que 2 h, está associado com a rápida degradação da proteína (Rogers *et al.*, 1986; Cohen, 1998). Como outras *SAMDCs*, *EgrSAMDC1* e *EgrSAMDC2* também apresentaram uma longa região 5' não-traduzida, na qual estão contidas duas outras seqüências codificadoras, denominadas *tiny* e *small* uORFs. Estudos sugerem que essas pequenas uORFs estão associadas com a regulação pós-transcricional, atuando na repressão da tradução quando os níveis celulares de poliaminas estão elevados (Franceschetti *et al.*, 2001, Hanfrey *et al.*, 2002). Este sistema estaria baseado na sobreposição das seqüências das duas uORFs, onde o último nucleotídeo do códon de parada (TAA) da *tiny* uORF também representa o primeiro nucleotídeo do códon de início (ATG) da *small* uORF. Dessa forma, a



*small* uORF não seria traduzida caso o ATG da *tiny* uORF fosse identificado primeiro pela maquinaria de tradução, conseqüentemente reprimindo a tradução da ORF principal (Franceschetti *et al.*, 2001; Hanfrey *et al.*, 2002). Tal estruturação, embora incomum à maioria dos genes conhecidos, é descrita para todas as SAMDCs conhecidas (Franceschetti *et al.*, 2001), sendo altamente conservada em nível de aminoácidos, como pôde ser observado nos alinhamentos apresentados (Capítulo 3, Figura 2A). Assim, baseado no fato de que as proteínas deduzidas a partir das seqüências nucleotídicas apresentaram todas as características importantes para suas regulações e funcionamentos, acreditamos que os cDNAs selecionados codificam proteínas funcionais. Entretanto, testes de complementação em leveduras mutantes, à semelhança do que realizaram Hao *et al.* (2005), poderiam ser realizados para comprovar a funcionalidade dessas proteínas. Alternativamente, a expressão em *E. coli* ou em plantas-modelo como *Arabidopsis* ou tabaco, e testes enzimáticos das enzimas recombinantes *in vitro* poderiam, igualmente, comprovar a funcionalidade das proteínas codificadas pelos cDNAs.

Em relação à estrutura de *MAPK* de *E. grandis*, no Capítulo 4 foram descritas as principais conclusões e, entre elas, a explicação para o tamanho do cDNA. Como descrito anteriormente, a obtenção da seqüência completa exigiu maiores esforços de subclonagens e seqüenciamento, além de diferentes oligonucleotídeos específicos para *EgrMAPK2*. A representação esquemática dos fragmentos seqüenciados constituem o Anexo 5. Este resultado permitiu que a seqüência nucleotídica fosse comparada a outras ORFs de *MAPKs* disponíveis e, com isso, foi possível detectar-se que apenas três regiões, não consecutivas e totalizando apenas 1,2 kb, apresentavam homologia com *MAPKs* mais próximas. Em função disso, suspeitou-se da presença de íntrons entre essas seqüências, indicando que o cDNA isolado poderia ser um transcrito imaturo, ou seja, não processado completamente, ou o produto de *splicing* alternativo. Esta hipótese foi comprovada quando as estruturas canônicas de sítios de processamento de mRNAs foram localizadas nas junções íntron/éxon, como pode ser verificado no Anexo 6. Além disto, a união dos supostos éxons determina uma ORF completa que, quando traduzida, resulta em uma proteína deduzida que apresenta os 11 domínios descritos para todas as famílias de *MAPKs* e também o motivo de ativação por fosforilação (TEY), localizado entre os sub-domínios VII and VIII (Hirt, 1997). Comparando os tamanhos dos éxons identificados, verificou-se que o tamanho do primeiro é muito maior que o dos dois

outros (846 bp, 181 bp e 173 bp, respectivamente). Como na literatura é descrito que os tamanhos dos éxons tipicamente variam de 100 a 300 bp (Fu, 2004), o primeiro “éxon” provavelmente já sofreu processamento e, neste caso, representaria a união de dois ou mais éxons. Por este motivo, os resultados permitem assumir que muito provavelmente ocorre o completo e correto processamento do transcrito isolado, embora não seja possível explicar o porquê da existência de uma forma imatura na célula. O processamento (*splicing*) alternativo em algum momento seria uma hipótese, já que este mecanismo é frequentemente descrito em MAPKs (Milanesi *et al.*, 2005). Em um trabalho em arroz, Xiong e Yang (2003) isolaram duas isoformas de uma MAPK5 codificadas por um único gene, mas uma delas era inativa por apresentar os subdomínios de III a VI ausentes. Os autores atribuíram o fato ao processamento alternativo, mas também não exploraram o significado do transcrito defeituoso para a célula. No presente estudo, o primeiro “éxon” codifica até o subdomínio IX, o que significa que o processamento inicial já teria incluído todos os domínios importantes para a atividade de cinase da enzima. Todas essas características apóiam a hipótese de que este transcrito, embora imaturo, pode ser processado completamente para formar a proteína completa. Talvez a presença desta forma imatura, isolada na construção das bibliotecas de cDNA do GENOLYPTUS, possa representar algum mecanismo de controle de tradução deste transcrito conforme o estado fisiológico da célula, mas não foram localizados na literatura relatos referentes a isso durante a execução do presente trabalho. Durante este período foram, porém, geradas plantas de tabaco e de soja transgênicas com *EgrMAPK2*, que poderão ser futuramente analisadas para verificar se esses sistemas permitem o processamento completo e a tradução de uma proteína completa e funcional.

A partir de análises de hibridização com DNA genômico e considerando a identificação de duas *SAMDCs*, concluiu-se que existem duas cópias de *SAMDC* no genoma de *E. grandis*. Resultados semelhantes foram descritos em outras espécies vegetais, como *Dianthus caryophyllus*, *Arabidopsis*, tabaco, *Brassica juncea*, arroz e maçã, para as quais mais de uma seqüência de *SAMDC* foi caracterizada (Lee *et al.*, 1997a; Lee *et al.*, 1997b; Franceschetti *et al.*, 2001; Pillai e Akiyama, 2004; Hao *et al.*, 2005). Da mesma forma, a partir da bibliografia, seria esperada apenas uma cópia genômica de MAPK, o que foi confirmado pela análise de

hibridização com DNA genômico com uma sonda derivada de *EgrMAPK2* (Fu *et al.*, 2002; Xiong e Yang, 2003).

Os resultados da análise de expressão de *EgrSAMDC2* indicaram que este transcrito é mais abundante em flores do que nos demais órgãos/tecidos de *E. grandis* testados, embora também estivesse presente em quantidades moderadas neles. Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos como, por exemplo, em Franceschetti *et al.* (2001), que descreveu maiores níveis de mRNAs *AdoMetDC2* em flores e folhas de *Arabidopsis* e uma distribuição mais abundante e ubíqua de *AdoMetDC1*; e em Lee *et al.* (1997a) que, de forma semelhante, já havia descrito a distribuição dos transcritos de *CSDC9* e *CSDC16*, as duas SAMDCs de *D. caryophyllus*. Em maçã, Hao *et al.* (2005) concluíram que as diferenças encontradas no padrão de expressão entre as duas SAMDCs em calos mantidos em cultura foram devidas ao diferente envolvimento desses genes nos processos fisiológicos e de desenvolvimento das células, onde um gene estaria mais envolvido no desenvolvimento floral e no crescimento celular do que o outro. O fato de existirem duas SAMDCs em eucalipto sugere essa diferença funcional, mas, em função das características da sonda utilizada, que provavelmente hibridizou com as duas SAMDCs, novos experimentos serão necessários para diferenciar o padrão exato de expressão de cada gene. A expressão observada em todos os tecidos testados provavelmente deve-se à importância das poliaminas para as células vegetais, nas quais participam na estimulação de divisão celular, regulação de rizogênese, embriogênese, senescência, desenvolvimento floral e amadurecimento de frutos, bem como resposta a estresses (para revisão, Bouchereau *et al.*, 1999; Kakkar e Sawhney, 2002).

Resultados preliminares de qRT-PCR com o uso de uma sonda específica para *EgrSAMDC2* indicaram que os tratamentos com ABA e alta salinidade foram capazes de induzir a expressão deste gene em plântulas de *E. grandis*, tomando-se por base o conteúdo total e momentâneo de mRNA para este gene. Por outro lado, UV e seca reduzem drasticamente a expressão do gene. Estes resultados indicam um possível envolvimento deste gene com respostas à salinidade, via sinalização por ABA. Experimentos semelhantes de qRT-PCR foram realizados com oligonucleotídeos específicos para *EgrMAPK2*. Neste caso, maior indução do gene foi observada nos tratamentos com KIN e sal (NaCl). Novamente, o tratamento com UV provocou redução na expressão, mas a seca não provocou alteração

significativa. Como seca, salinidade e frio frequentemente provocam efeitos de estresses semelhantes, como revisado no Capítulo 2, os experimentos serão repetidos com outras amostras biológicas, que já foram preparadas em condições idênticas para excluir a possibilidade de que os resultados tenham sido determinados por alguma anormalidade das plântulas. Também estão sendo projetados oligonucleotídeos específicos para *EgrSAMDC1*, para verificar o padrão de expressão deste gene em resposta aos diferentes estímulos.

Muitos dos trabalhos que descrevem estudos de expressão utilizam calos provenientes de cultura *in vitro* ou disco foliares submergidos em substâncias capazes de simular estresses (Hao *et al.*, 2005, Hu *et al.*, 2005b), o que dificulta comparações diretas com os resultados de expressão obtidos neste trabalho. Em outras publicações, já foram utilizadas plantas inteiras de arroz, mas existe a possibilidade de que as concentrações das substâncias utilizadas nos nossos tratamentos não tenham sido suficientemente altas para induzir efetivamente estresses em plântulas de eucalipto. Além disto, existe a possibilidade da existência de maior pico de expressão em um tempo anterior ou posterior ao testado (16 h). Para esclarecer estas dúvidas, a partir dos resultados definitivos de expressão, os tratamentos que induzirem significativamente a expressão dos genes deverão ser repetidos em tempos diferentes e, quando pertinente, em concentrações diferentes.

Os resultados de expressão dos genes descritos, embora preliminares, sugerem que ambos os genes, além de um provável envolvimento com funções celulares básicas, apresentam um potencial envolvimento com respostas celulares à salinidade. Esse resultado é interessante do ponto de vista biotecnológico, pois poderia ser futuramente utilizado para geração de plantas transgênicas de interesse econômico. Porém, antes desta etapa, experimentos mais detalhados deverão ser realizados para comprovar a funcionalidade dessas proteínas. Além disso, plantas-modelo transgênicas poderão ser utilizadas para bioensaios preliminares, visto que espécies de interesse agrônômico, como a soja e o próprio eucalipto, implicarão em tempos mais prolongados de cultura para obtenção de material para as análises.

Finalmente, o advento de técnicas sensíveis e de múltiplas amostras, como as análises de micro e macroarranjos, que apresentam elevado potencial de análise de uma grande quantidade de dados simultaneamente, deverão contribuir significativamente para a identificação mais precisa de vários outros genes relacionados à seca dentro do genoma de *E.*

*grandis*. Além disto, outras espécies de eucalipto, utilizadas no GENOLYPTUS, poderão ser avaliadas e comparadas entre si na busca de genes mais específicos de resposta à seca.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (Capítulos I, II e V)

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2003) *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15:63-78.
- Abebe T, Guenzi AC, Martin B and Chushman JC (2003) Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol* 131:1748-1755.
- AEB - Associação de Comércio Exterior do Brasil (2006) Principais Produtos de Exportação por Fator Agregado em 2003 e 2004.
- Aharon R, Shahak Y, Wininger S, Bendov R, Kapulnik Y and Galili G (2003) Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell* 15:439-447.
- Alvim FC, Carolino SMB, Cascardo JCM, Nunes CC, Martinez CA, Otoni WC and Fontes EPB (2001) Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol* 126:1042-1054.
- Babu RC, Zhang JX, Blum A, Ho THD, Wu R and Nguyen HT (2004) HVA1, an LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Sci.* 166:855-862.
- Bahieldin A, Mahfouz HT, Eissa HF, Saleh OM, Ramadan AM, Ahmed IA, Dyer WE, El-Itriby HA and Madkour MA (2005) Field evaluation of transgenic wheat plants stably expressing the *HVA1* gene for drought tolerance. *Physiol Plant* 123:421-427.
- Basnayake J, Cooper M, Ludlow MM, Henzell RG and Snell PJ (1995) Inheritance of osmotic adjustment to water stress in three grain sorghum crosses. *Theor Appl Genet* 90:675-682.
- Bohnert HJ, Nelson DE and Jensen RG (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell.* 7:1099-1111.
- Bohnert HJ and Jensen RG (1996) Strategies for water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol* 14:89-97.
- Bohnert H and Shevelava E (1998) Plant stress adaptations - making metabolism move. *Curr Opin Plant Biol* 1:267-274.
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F and Martin-Tanguy J (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* 140:103-125.

- Boudsocq M and Laurière C (2005) Osmotic signaling in plants. multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiol* 138:1185-1194.
- Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218:443-448.
- Bray EA. (1993) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol* 103:1035-1040.
- Bray EA (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2:48-54.
- Bray EA (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 55:2331-2341.
- Bruce WB, Edmeades GO and Barker TC (2002) Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *Jour Exp Bot* 53:13-25.
- Burnet M, LaFontaine PJ and Hanson AD. (1995) Assay, purification, and partial characterization of choline monooxygenase from spinach. *Plant Physiol* 108:581-588.
- Capell T, Bassie L and Christou P (2004) Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proc Natl Acad Sci of USA* 101:9909-9914.
- Capell T (2004) Enhanced drought tolerance in transgenic rice. ISB News Report August: 4-5. <http://www.isb.vt.edu>.
- Chaves MM and Oliveira MM (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *J Exp Bot* 407:2365-2384.
- Cheong YH, Chang H-S, Gupta R, Wang X, Zhu T and Luan S (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129:661-677.
- Chinnusamy V, Schumaker K and Zhu JK (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot* 55:225-236.
- Close TJ (1997) Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant* 100:291-296.
- Cohen SS (1998) A guide to the polyamines. Oxford University Press, New York, 1-595 pp.
- Cushman JC and Bohnert HJ (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr Opin Plant Biol* 3:117-124.
- de Vries GE (2000) Climate changes lead to unstable agriculture. *Trends Plant Sci.* 5:367.

- Dure LI (1993) Structural motifs in Lea proteins. In: Close TJ, Bray EA (eds) Plant response to cellular dehydration during environmental stress. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 91-103.
- Evans PT and Malmberg RL (1989) Do polyamines have roles in plant development? *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40:235-269.
- FAO – Food and Agriculture Organization (2003) Forest products and services. <http://www.fao.org/forestry/index.jsp>
- Feder ME and Hofmann GE (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61:243-282.
- Flowers TJ and Yeo AR (1995) Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *Aust J Plant Physiol* 22:875-884.
- Foyer CH and Noctor G (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plant* 119:355-364.
- Franceschetti M, Hanfrey C, Scaramagli S, Torrigiani P, Bagni N, Burtin D and Michael AJ (2001) Characterization of monocot and dicot plant S-adenosyl-l-methionine decarboxylase gene families including identification in the mRNA of a highly conserved pair of upstream overlapping open reading frames. *Biochem J* 353:403-409.
- Fu S-F, Chou W-C, Huang D-D and Huang H-J (2002) Transcriptional regulation of a rice mitogen-activated protein kinase gene, *OsMAPK4*, in response to environmental stresses. *Plant Cell Physiol* 43:958-963.
- Fu X-D (2004) Towards a Splicing Code. *Cell* 119:736-738.
- Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2005) AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:3470-3488.
- Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Do Choi Y, Kochian LV and Wu RJ (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15898–15903.
- Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL and Fink GR (2001) Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>-pump. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11444-11449.



- Goddijn OJM, Verwoerd TC, Voogd E, Krutwagen RWHH, Graaf PTHMD, Poels J, Dun KV, Ponstein AS, Damm B and Pen J (1997) Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol* 113:181-190.
- Guo C and Oosterhuis DM (1997) Effect of water-deficit stress and genotypes on pinitol occurrence in soybean plants. *Environ Exp Bot* 37:2-5.
- Gustin MC, Albertyn J, Alexander M and Davenport K (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1264-1300.
- Gutterson N and Reuber TL (2004) Regulation of disease resistance pathways by *AP2/ERF* transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* 7:465-471.
- Haake V, Cook D, Riechmann JL, Pineda O, Thomashow MF and Zhang JZ (2002) Transcription factor *CBF4* is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130:639-648.
- Hanfrey C, Franceschetti M, Mayer MJ, Illingworth C and Michael AJ (2002) Abrogation of upstream open reading frame-mediated translational control of a plant S-adenosylmethionine decarboxylase results in polyamine disruption and growth perturbations. *J Biol Chem* 277:44131-44139.
- Hao Y-J, Zhang Z, Kitashiba H, Honda C, Ubi B, Kita M and Moriguchi T (2005) Molecular cloning and functional characterization of two apple S-adenosylmethionine decarboxylase genes and their different expression in fruit development, cell growth and stress responses. *Gene* 350:41-50.
- Hare PD and Cress WA (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul* 21:79-102.
- Härndahl U, Hall RB, Osteryoung KW, Vierling E, Bornman JF and Sundby C (1999) The chloroplast small heat shock protein undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plants from oxidative stress. *Cell Stress Chaperones* 4:129-138.
- Hirt H (1997) Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends Plant Sci* 2:11-15.
- Hoekstra FA, Golovina EA and Buitink J (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci* 6:431-438.
- Holmström KO, Mantyla E, Welin B, Mandal A, Palva ET, Tunnela OE and Londesborough J (1996) Drought tolerance in tobacco. *Nature* 379:683-684.

- Hsieh TH, Lee JT, Charng YY and Chan MT (2002a) Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis CBF1* show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiol* 130:618-626.
- Hsieh TH, Lee JT, Yang PT, Chiu LH, Charng YY, Wang YC and Chan MT (2002b) Heterology expression of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiol* 129:1086-1094.
- Hu W-W, Gong H and Pua EC (2005b) Molecular cloning and characterization of S-adenosylmethionine decarboxylase genes from mustard (*Brassica juncea*). *Physiol Plant* 124:25-40.
- Huang Y, Li H, Gupta R, Morris PC, Luan S and Kieber JJ (2000a) *ATMPK4*, an *Arabidopsis* homolog of mitogen-activated protein kinase, is activated *in vitro* by AtMEK1 through threonine phosphorylation. *Plant Physiol* 122:1301-1310.
- Huang J, Hirji R, Adam L, Rozwadowski KL, Hammerlindl JK, Keller WA and Selvaraj G (2000b) Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiol* 122:747-756.
- Hur J, Jung K-H, Lee C-H and An G (2004) Stress-inducible *OsP5CS2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Sci* 167:417-426.
- Ichimura K, Mizoguchi T, Irie K, Morris P, Giraudat J, Matsumoto K and Shinozaki K (1998) Isolation of *ATMEKK1* (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun* 253:532-543.
- Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, Yuasa T and Shinozaki K (2000) Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases *ATMPK4* and *ATMPK6*. *Plant J* 24:655-665.
- Ingram J and Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:377-403.
- IPCC (2001) Climate change 2001: the scientific basis. Contribution of working group I to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M, van der Linden PJ and Xiaosu D (eds) Cambridge University Press, Cambridge, pp 881.
- Iturriaga G, Schneider K, Salamini F and Bartels D (1992) Expression of desiccation-related proteins from the resurrection plant in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* 20:555-558.

- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O and Thomashow MF (1998) *Arabidopsis CBF1* overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280:104-106.
- Jamaux I, Steinmetz A and Belhassen E (1997) Looking for molecular and physiological markers of osmotic adjustment in sunflower. *New Phytol* 137:117-127.
- Jang IC, Oh SJ, Seo JS, Choi WB, Song SI, Kim CH, Kim YS, Seo HS, Do Choi Y, Nahm BH and Kim JK (2003) Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphatephosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiol* 131:516-524.
- Jofuku KD, den Boer BGW, Van Montagu M and Okamoto JK (1994) Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* 6:1211-1225.
- Kacperska A (2004) Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? *Physiol Plant* 122:159-168.
- Kakkar RK and Sawhney VK (2002) Polyamine research in plants - a changing perspective. *Physiol Plant* 116:281-292.
- Kang J-Y, Choi H-I, Im M-Y and Kim SY (2002) *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* 14:343-357.
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnol* 17:287-291.
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (2004) A combination of the *Arabidopsis DREB1A* gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *plant cell physiol* 45:346-350.
- Kasukabe Y, He L, Nada K, Misawa S, Ihara I and Tachibana S (2004) Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 45:712-722.
- Kavi Kishor PB, Hong Z, Miao G-H, Hu C-AA and Verma DPS (1995) Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol* 108:1387-1394.

- Kawaguchi R, Girke T, Bray EA and Bailey-Serres J (2004) Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 38:823-839.
- Koornneef M, Léon-Kloosterziel KM, Schwartz SH and Zeevaart JAD (1998) The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 36:83-89.
- Koster KL (1991) Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol* 96:302-304.
- Kreps JA, Wu Y, Chang H-S, Zhu T, Xun W and Harper J (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol* 130:2129-2141.
- Kumar A, Taylor MA, Arif SAM and Davies HV (1996) Potato plants expressing antisense and sense S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. *Plant J* 9:147-158.
- Kumria R and Rajam MV (2002) Ornithine decarboxylase transgene in tobacco affects polyamines, in vitro-morphogenesis and response to stress. *J Plant Physiol* 159:983-990.
- Laporte MM, Shen B, Tarczynski MC (2002) Engineering for drought avoidance: expression of maize NADP-malic enzyme in tobacco results in altered stomatal function. *J Exp Bot* 53:699-705.
- Lee MM, Lee SH and Park KY (1997a) Characterization and expression of two members of the S-adenosylmethionine decarboxylase gene family in carnation flower. *Plant Mol Biol* 34:371-382.
- Lee T, Liu J-J and Pua E-C (1997b) Molecular cloning of two cDNAs (accession nos. X95729 and U80916) encoding S-adenosyl-L-methionine decarboxylase in mustard (*Brassica juncea* fL.1 Czern & Coss). *Plant Physiol* 115:1287.
- Lewin, B (2001) *Genes VII*. Editora Artes Médicas, Porto Alegre, 990 p.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (1998) Two transcription factors, *DREB1* and *DREB2*, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1391-1406.
- Li Z-Y and Chen S-Y (2000) Differential accumulation of the S-adenosylmethionine decarboxylase transcript in rice seedlings in response to salt and drought stresses. *Theor Appl Genet* 100:782-788.

- Malik MK, Slovin JP, Hwang CH, Zimmerman JL (1999) Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, *Hsp17.7*, results in increased or decreased thermotolerance. *Plant J* 20:89-99.
- Martin-Tanguy J (2001) Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regul* 34:135-148.
- Mattana M, Biazzi E, Consonni R, Locatelli F, Vannini C, Provera S and Coraggio I (2005) Overexpression of *Osmyb4* enhances compatible solute accumulation and increases stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 125:212-223.
- Maurel C, Reizer J, Schroeder JI and Chrispeels MJ (1993) The vacuolar membrane protein – TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 12:2241-2247.
- McKersie BD, Bowley SR, Harjanto E and Leprince O (1996) Water deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol* 111:1177-1181.
- Milanesi *et al.* (2005) Systematic analysis of human kinase genes: a large number of genes and alternative splicing events result in functional and structural diversity. *BMC Bioinformatics* 6:S20.
- Mitra J (2001) Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Curr Sci* 80:758-763.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 9:405-410.
- Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Furihata T, Abe H, Narusaka M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J* 34:137-148.
- Neilson D (2000) The global *Eucalyptus* resource and some solidwood-panel product developmental issues. IUFRO Conference, Launceston, Austrália.
- Nepomuceno AL, Oosterhuis DM and Stewart JM (1998) Physiological responses of cotton leaves and roots to water deficit induced by polyethylene glycol. *Environ Exp Bot*, 40:29-41.
- Nepomuceno AL, Stewart JM, Oosterhuis DM, Turley R, Neumaier N and Farias JRB (2000) Isolation of a cotton NADP(H) oxidase homologue induced by drought stress. *Pesq Agropec Bras* 35:1407-1416.

- Nuccio ML, Rhodes D, McNeil SD and Hanson AD (1999) Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr Opin Plant Biol* 2:128-134.
- Oberschall A, Deak M, Torok K, Sass L, Vass I, Kovacs I, Feher A, Dudits D and Horvath GV (2000) A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. *Plant J* 24:437-446.
- Oh S-J, Song SI, Kim YS, Jang H-J, Kim SY, Kim M, Kim Y-K, Nahm BH and Kim J-K (2005) *Arabidopsis* *CBF3/DREB1A* and *ABF3* in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiol* 138:341-351.
- Ohme-Takagi M and Shinshi H (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* 7:173-182.
- Pellegrineschi A, Reynolds M, Pacheco M, Brito RM, Almeraya R, Yamaguchi-Shinozaki K and Hoisington D (2004) Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* *DREB1A* gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. *Genome* 47:493-500.
- Pfannschmidt T (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci* 8:33-41.
- Pignocchi C and Foyer C (2003) Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Curr Opin Plant Biol* 6:379-389.
- Pillai MA and Akiyama T (2004) Differential expression of an S-adenosyl-L-methionine decarboxylase gene involved in polyamine biosynthesis under low temperature stress in *japonica* and *indica* rice genotypes. *Mol Gen Genomics* 271:141-149.
- Pilon-Smits EAH, Ebskamp MJM, Paul MJ, Jeuken MJW, Weisbeek PJ and Smeekens SCM (1995) Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol* 107:125-130.
- Pilon-Smits EAH, Terry N, Sears T, Kim H, Zayed AM, Hwang SB, van Dun K, Voogd E, Verwoerd TC, Krutwagen WHH and Goddijn OJM (1998) Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *J Plant Physiol* 152:525-532.
- Pilon-Smits EAH, Terry N, Sears T, Kim H and van Dun K (1999) Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. *Plant Physiol Biochem* 37:313-317.
- Price AM, Atherton NM and Hendry GAF (1989) Plants under drought-stress generate activated oxygen. *Free Rad Res Commun* 8:61-66.

- Quan R, Shang M, Zhang H, Zhao Y and Zhang J (2004) Improved chilling tolerance by transformation with *betA* gene for the enhancement of glycinebetaine synthesis in maize. *Plant Sci* 166:141-149.
- Qin X and Zeevaart JAD (2002) Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiol* 128:544-551.
- Ramanjulu S and Bartels D (2002) Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ* 25:141-151.
- Rogers S, Wells R and Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234:364-368.
- Rohila JS, Jain RK and Wu R (2002) Genetic improvement of Basmati rice for salt and drought tolerance by regulated expression of a barley *Hva1* cDNA. *Plant Sci*. 163:525-532.
- Rhodes D and Hanson AD (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44:357-384.
- Rizhski L, Liang H and Mitler R (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol* 130:1143-1151.
- Rizhski L, Liang H, Shuman J, Davletova and Mitler R (2004) When defense pathways collide: the response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol* 134:1-14.
- Romero C, Belles JM, Vayá JL, Serrano R and Culiáñez-Maciá A (1997) Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco: pleiotropic phenotypes include drought resistance. *Planta* 201:293-297.
- Roy M and Wu R (2001) Arginine decarboxylase transgene expression and analysis of environmental stress tolerance in transgenic rice. *Plant Sci* 160:869-875.
- Roy M and Wu R (2002) Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. *Plant Sci* 163:987-992.
- Saijo Y, Hata S, Kyojuka J, Shimamoto K and Izui K (2000) Over-expression of a single Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J* 23:319-327.
- Schröder G and Schröder J (1995) cDNAs for S-adenosyl-L-methionine decarboxylase from *Catharanthus roseus*, heterologous expression, identification of the proenzyme-

processing site, evidence for the presence of both subunits in the active enzyme, and a conserved region in the 5' mRNA leader. *Eur J Biochem* 228:74-78.

Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A and Sakurai T (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold, and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* 31:279-292.

Seki M, Kameiy A, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (2003) Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Curr Opin Biotechnol* 14:194-199.

Seki M, Satou M and Sakurai T (2004) RIKEN *Arabidopsis* fulllength (RAFL) cDNA and its applications for expression profiling under abiotic stress conditions. *J Exp Bot* 55:213-223.

Sheen J (1996) Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* 274:1900-1902.

Shen B, Jensen RG and Bohnert HJ (1997) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol* 113:1177-1183.

Shen B, Hohmann S, Jensen RG and Bohnert HJ (1999) Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant Physiol* 121:45-52.

Sheveleva E, Chmara W, Bohnert HJ and Jensen RG (1997) Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol* 115:1211-1219.

Sheveleva EV, Marquez S, Chmara W, Zegeer A, Jensen RG and Bohnert HJ (1998) Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco. *Plant Physiol* 117:831-839.

Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (1996) Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotechnol* 7:161-167.

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

Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3:217-223.



- Shou H, Bordallo P and Wang K (2004) Expression of the *Nicotiana* protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. *J Exp Bot* 399:1013-1019.
- Sivamani E, Bahieldin A, Wraith JM, Al-Niemi T, Dyer WE, Ho T-HD and Qu R (2000) Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene. *Plant Sci* 155:1-9.
- Smirnov N (1998) Plant resistance to environmental stress. *Curr Opin Biotechnol* 9:214-219.
- Sonnewald U (2003) Plant biotechnology: from basic science to industrial applications. *J Plant Physiol* 160: 723–725.
- Sun W, Bernard C, van de Cotte B, van Montagu M and Verbruggen N (2001) *At-HSP17.6A*, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. *Plant J* 27:407-415.
- Sunkar R, Bartels D and Kirch HH (2003) Overexpression of a stress inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant J* 35:452-464.
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 29:417-426.
- Tamura T, Hara K, Yamaguchi Y, Koizumi N and Sano H (2003) Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiol* 131:454-462.
- Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:571-599.
- Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F and Kaldenhoff R (2003) The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions. *Nature* 425:734-737.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2000) *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11632-11637.
- Urao T, Katagiri T, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Hayashida N and Shinozaki K (1994) Two genes that encode Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 244:331-340.

- Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T and Shinozaki K (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* 11:1743-1754.
- Vierling E (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42:579-620.
- Waie B and Rajam MW (2003) Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine gene. *Plant Sci* 164:727-734.
- Walden R, Cordeiro A and Tiburcio AF (1997) Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol* 113:1009-1013.
- Wang WX, Vinocur B, Shoseyov O and Altman A (2001) Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Hort* 560:285-292.
- Wang WX, Vinocur B, Shoseyov O and Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1-14.
- Wang Y, Ying J, Kuzma M, Chalifoux M, Sample A, McArthur C, Uchacz T, Sarvas C, Wan J, Dennis DT, McCourt P and Huang Y (2005) Molecular tailoring of farnesylation for plant drought tolerance and yield protection. *Plant J* 43:413-424.
- Watson MB, Emory KK, Piatak RM and Malmberg RL (1998) Arginine decarboxylase (polyamine synthesis) mutants of *Arabidopsis thaliana* exhibited altered root growth. *Plant J* 13:231-239.
- Williams RJ and Leopold DAC (1989) The glassy state in corn embryos. *Plant Physiol* 89:977-981.
- Xiong H, Stanley BA, Tekwani BL and Pegg AE (1997) Processing of mammalian and plant S-adenosylmethionine decarboxylase pro-enzymes. *J Biol Chem* 272:28342-28348.
- Xiong L and Zhu J-K (2001) Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. *Physiol Plant* 112:152-166.
- Xiong L, Ishitani M, Lee H and Zhu J-K (2001). The *Arabidopsis* LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* 13:2063-2083.
- Xiong L, Schumaker KS and Zhu J-K (2002a) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14:165-183.

- Xiong L, Lee H, Ishitani M and Zhu J-K (2002b) Regulation of osmotic stress responsive gene expression by LOS6/ABA1 locus in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277:8588-8596.
- Xiong L and Yang Y (2003) Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 15:745-759.
- Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho T-HD and Wu R (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA7*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol* 110:249-257.
- Yamada S, Katsuhara M, Kelly W, Michalowski CB and Bohnert H (1995) A family of transcripts encoding water channels proteins: Tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* 7:1107-1112.
- Yeo A (1998) Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J Exp Bot* 49:915-929.
- Yang C-Y, Chen Y-C, Jauh GY, and Wang C-S (2005) A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139:836-846.
- Zaha, A et al. (2003) *Biologia Molecular Básica*. 3° ed. Mercado Aberto, Porto Alegre, 421 p.
- Zhang J-Y, Broeckling CD, Blancaflor EB, Sledge MK, Sumner LW and Wang Z-Y (2005a) Overexpression of *WXPI*, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant J* 42:689-707.
- Zhang S-Z, Yang B-P, Feng C-L and Tang H-L (2005b) Genetic transformation of tobacco with the trehalose synthase gene from *Grifola frondosa* Fr. enhances the resistance to drought and salt in tobacco. *J Integr Plant Biol* 47:579-587.
- Zhu J, Hasegawa PM and Bressan RA (1997) Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Crit Rev Plant Sci* 16:253-277.
- Zhu BC, Su J, Chan MC, Verma DPS, Fan Y-L and Wu R (1998) Over-expression of a  $\Delta$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water-stress and salt stress in transgenic rice. *Plant Sci* 139:41-48.
- Zhu J-K (2001) Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr Opin Plant Biol* 4:401-406.
- Zhu J-K (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53:247-273.

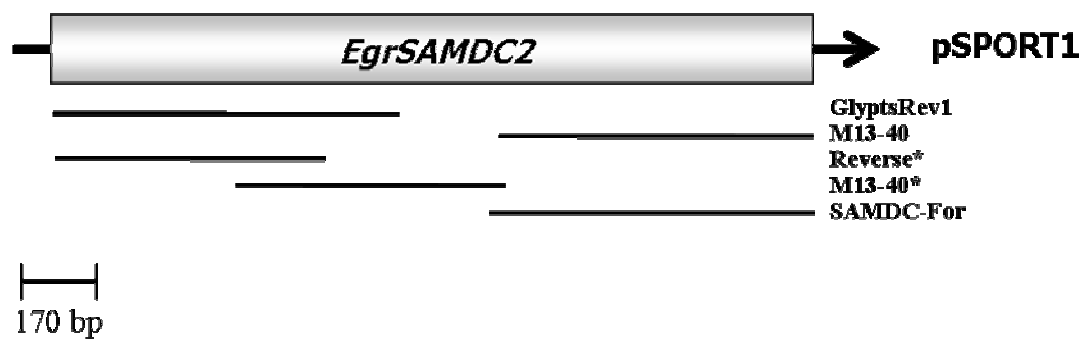
## **ANEXO I**

**Anexo 1:** Seleção de clones de cDNA codificadores de proteínas potencialmente relacionadas à tolerância à seca a partir do banco de ESTs do Projeto GENOLYPTUS.

<b>CLONE</b>	<b>EST</b>	<b>Proteína codificada</b>	<b>Observações</b>
<i>EpeMAPKKK-1</i>	EUPE-XY-004-016-D06-RS.R	proteína-cinase-cinase-cinase ativada por mitógenos	parcial, com cerca de 770 aa a menos
<i>EglMAPKKK-2</i>	EUGL-XY-001-123-G05-AF.R	proteína-cinase-cinase-cinase ativada por mitógenos	parcial, com cerca de 240 aa a menos
<i>EpeNPK1-c</i>	EUPE-XY-000-003-G08-MG.R	MAPKKK de tabaco	parcial, com cerca de 50 aa a menos
<i>EgrMAPK5-h</i>	EUGR-ML-000-040-G06-BA.R	proteína-cinase ativada por mitógenos	potencialmente completa
<i>EspSPS1a</i>	EUSP-FX-001-044-G05-BA.R	sacarose-fosfato-sintase	parcial, com cerca de 465 aa a menos (isca sem início claro- proteína grande)
<i>EgrSPDS-2</i>	EUGR-PU-003-024-E10-MG.R	espermidina-sintase	parcial, isca parcial
<i>EpeSPDS-1</i>	EUPE-XY-003-003-E12-CN.R	espermidina-sintase	parcial, com -45 aa
<i>EurSPDS-4</i>	EUUR-XY-000-080-A12-BA.R	espermidina-sintase	parcial, com -70 aa
<i>EgrSPDS-4b</i>	EUGR-SE-001-121-C06-GO.R	espermidina-sintase	potencialmente completa, com cerca de 12 aa a mais
<i>EgrSPDS-5b</i>	EUGR-PU-000-004-H09-MG.R	espermidina-sintase	potencialmente completa, com cerca de 50 aa a mais
<i>EgrSAMDC a-4</i>	EUGR-TS-002-010-F05-CN.R	S-adenosilmetionina-descarboxilase	potencialmente completa
<i>EspSAMDC-b</i>	EUSP-FX-001-043-G02-BA.R	S-adenosilmetionina-descarboxilase	parcial, com cerca de 70 aa do que a isca
<i>EspADC</i>	EUSP-FX-001-047-D01-CN.R	arginina-descarboxilase	parcial, com -290 aa
<i>EgrDREB1-1</i>	EUGR-SE-001-075-E06-GO.S	proteína de ligação ao elemento responsivo à desidratação	potencialmente completa, com cerca de 30 aa
<i>EgrDREB2A-1a</i>	EUGR-PU-000-009-D12-MG.R	proteína de ligação ao elemento responsivo à desidratação	potencialmente completa, com cerca de 85 aa a mais
<i>EurP5CS1</i>	EUUR-XY-000-091-F09-BA	Delta-1-pirrolina-5-carboxilado-sintetase	parcial, com -300 aa (isca grande)

## **ANEXO II**

**Anexo 2:** Fragmentos gerados e seqüenciados de *EgrSAMCD2*.



\* Fragmentos seqüenciados em pSK<sup>+</sup>

## **ANEXO III**



**Anexo 3:** Seqüência nucleotídica completa do cDNA *EgrSAMDC1*. Seqüências sombreadas representam as regiões codificadoras; em negrito, a seqüência da *tiny* uORF.

GTCCGCGACCATCCTCGCCTCCCCAGACAGTCCCCAGAAATCATCATCAGTTCGGGCGGCCGTCAATCCCTACCC  
TTCAATCGCCCCGCCCCGCCCCGCTCCCCGCTCCGCTCCCCCTCCCCTCTTGCATCGATCTGTCTGAAAAGACTCA**ATG**  
**ATCTAA**TGGAGTCAAAAGGTGGCAAGAAGATGTCTAGTAGTAAACCTTCATTCTATGAAGCCCCCTTTGGTTACCG  
CATTGAAGACGTCAGACCCAACGGTGGCATCAAGAAGTTCCGATCAGCTGCTTACTCCAACCTGTGTGCGCAAACCA  
TCCTGACATCCCCCATTGGCATCTCGATTCTTGACCACTTGAGGTGGTCAATTTTCTGGTCTCGAAATAATTTCA  
TTTTTTTCTCCTCCTCCAAGAAAAAGTCTTTCTGTTCCTCTCTCCCTCCTCTCTGCAACTTCAATCTCTCTGCAAG  
CTGGGAATCCTTGTTACAGCAATGGATCTTGAAGTTTCTGCAATTGGCTTTGAAGGTTATGAAAAGAGGCTAGAAA  
TATCATTTTACGAGCCTGGACTTTTGGTGATCCAGATGGGAGAGGTCTCCGGTCGCTCTCTAGGGCTCAGTTGGA  
CGAGATTATAAAACCAGCTGAATGTACCATAGTCTCGTCGCTCTCTAATGACCATGTGCGATTCCCTATGTGCTGTCA  
GAGTCTAGCCTCTTCGTCTACCCCTATAAAGATTGTCATTA AAAACCTGTGGCAGCACAAGGCTACTTAAAGTCCATTC  
CACCCATCTTGAATTTGGCAGGCTCTCTTTCCCTTACTGTAAGATCTGCAAAGTACACTCGCGGTTGTTTTCTATG  
CCCTGGAGCTCAGCCATACCCCTACCGTAACTTCAGCGAAGAAGTTTATGTCCTTGACCGTTATTTTGGAAATCTT  
GGCTCAGGAAGAAAGGCCTATCTTTGGGTGGATCCAACAAAACCAAAGATGGCACGTGTATTCTGCTTCTGCAG  
ATGAAGTCGAGTCTGTTTTCCCTGTTTACACTATGGAGATATGCATGACCGGTTTAAACAAGGAGTCGTCTTCTGT  
GTTCTTCAAATTTCAAATCGGGCAGTGCAGCTGCTATGACCATCAATTCTGGAATCAGAAAGATTCTTCCCAATTCC  
GAGATTTGTGCTTTTGGATTCGAACCTTGTGGTTATTCCATGAATGCTATTGAAGGCTCTGCAACGTCCACCATTC  
ATGTCACCCCAGAAGACGGATTTAGCTATGCCAGCTTTGAGGCAGTGGGATATGACCCAAAGGATATCAATTACAA  
CCAGTTGATTGGGAGGGTACTGGCTTGTTCGACCAAAGGAGTTCTCCGTGGCAGTGCATGCCAATGTTGCAGCT  
AAGTCACCTTGAGCAAACTGTTCTCTGAATGTTAAGGGTACTGCAGTGGAGAGCGGTGCCTTGAAGAGCTTGGAG  
CAGGCGGTTCCATCATGTACCAGAGGTTTGTGATGACTGGTCGCTCCGCGCGGCCTACTATGTTGATTTCTAAAAT  
CTGAACGCTGCTGGAGGGAGGACGGGGATGGTTCCTGTTCAATTTTACGTTTGCATTTCTTAGTCGAATAAAGT  
CACTTCATACATGTCAATCCTACCGGATATGTGATGTTGCTGTGTTGCTCATCATACTTCTCTTTTCATTGCTGG  
AATATTATGGACAAAATTTAGCAATTTGGTATGTTGGTGTAGAAGGAAACGGAGATGCTATCTATCCTGTTGCCCTC  
CGTTTTGACTTTTTGAAACATGTGTTTGTACGGGCCAAAAGGTTCTGGCTGTGGAATGGTCAGTGT

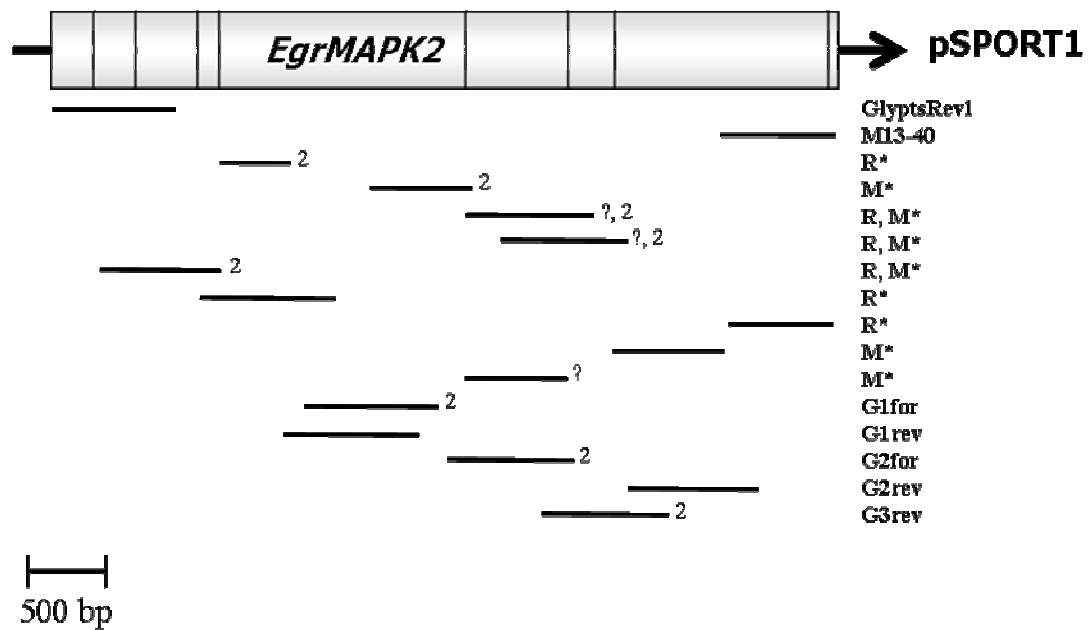
## ANEXO IV

**Anexo 4:** Seqüência nucleotídica completa do cDNA *EgrSAMDC2*. Seqüências sombreadas representam as regiões codificadoras; em negrito, a seqüência da *tiny* uORF.

CTCTACCGCGTCCCGTACGCGAGCCTCAATACAGATCTGAAAAC**GAATGAACTAA**TGGAGTC  
AAAAGGTGGGAAAAAGAAGTCTAGCAGTAGTAAATCCTTATTCTACGAAGCTCCCCTCGGTTA  
CAGCATCGAAGACCTTCGTCCACACGGTGGCATCAAGAAGTTCAGATCGGCTGCTTACTCCAA  
CTGCGCAAGAAAGCCATCCTGAGATTCCCAAGCAGTGGCGTGATCCTTTAGATTCTGCAATT  
TTGTTTCAAGTCATAATAGCTGTAGTTCTGCTGTCTCTGTTTCTTTTCAACTTCGATCATCCT  
CTCGTTCTCTCTCGCAACTCGTTCTCAACTGCTCGCTCACTTTCTGAAAGTCGAGATGGCATT  
GTCAGTTTCCCCCATCGGGTTTGAGGGTTACGAAAAGAGGCTCGAGCTCACATTCTATGAGCC  
TGGAATTTTTGCTGATCCTGAAGGGATGGGTCTCCGCTCATTGTCCAAATCCCAGTTGGATGA  
GTTTCTGAAATTAGCTGAGTGCACCATCGTTTCTTCGCTGTCAAATGAGTTCGTTGACTCTTA  
CGTCCTTTCAGAGTCTAGCCTCTTTGTGTACCCCTACAACTCATCATCAAGACTTGCGGGAC  
TACAAAGTTACTTCTTTCCATTCAGCCATCCTCAGATTGGCTGATTCCCTGTCCCTTTCTGT  
CAAGTCTGTGAGGTACACTCGTGGGAGCTTTATATTCCCCGGTGCCAGCATTTCCCGCATCG  
GAACTTCTCAGAGGAAGTAGCTGTCTCGATACCTACTTTGGTAATCTTGGCGCTGGCAGCAA  
GGCGTATCTGATGGGCAGTCCGAAAGGGCTCAGAAATGGCATGTTTATTCTGCTTCTGCTGA  
GAAGACGAGCCTCTCAGATTCGGTTTTCACTCTCGAGATGTGTATGACTGGTCTTGGCAAGCA  
AAGGGCATCCGTCTTCTCAAAGAGAACTCGCCCTCAGCTGCAGCTATGACAGAGGAGTCTGG  
CATTCGGAAGATTCTTCCAAAGTCTGATATCTGCGATTTTGATTTTGATCCCTGTGGCTACTC  
CATGAATGCTATTGAAGGGAGTGGAATCTCAACCATCCATGTCACTCCAGAAGATGGTTTTAG  
TTATGCCAGTTTTGAGGCTGTTGGCTATGATTTTAAGGCTGCGGATCTGTCCCAGCTGATCCA  
GAGGTGTTGGTCTGCTTCGAGCCAACCGAGTTCTCTGTGGCTCTCCATTCCGATTTAGCTGG  
CGAGGATCTGGTGTGAGGTTCCCTCTCGACCTGAAGGGGTACAGTGCTGGAGAAACGAGTTG  
CGAGGCGCTTGAAAAGGTGGTTCTATCATGTACATGAGCTTCGCCGGAACAGGAAGCTGTGG  
ATCCCAAGGTCCATCCTGAAGTGCTGTTGGAGCGAGGACGAGAAAGATGAGGAAGTCGAAGA  
GAAATAGTGGTCAATTAATAAGTAGTATGAATAAGTAGAGCTTGTGGCCGTGTTGTCTTGGGA  
GCACAACATTGAGCTCGAGTCTGTCATTGTCGTTTTATTTCTTGCTTCGTTTGTATTGGGCG  
TCGTAGTTGCTCTTCTTGTGAGTCTCGCGGTCTGAGTCTGAGACAGTGTTCATGGTGCGGATG  
TGTTGCAGATATGAGATCATTCTGTGTTTTCTGTCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAA

## **ANEXO V**

**Anexo 5:** Fragmentos gerados e seqüenciados de *EgrMAPK2*.



\* Fragmentos seqüenciados em pSK<sup>+</sup>;

**R** – Reverse;

**M** - M13-40;

**2** – fragmentos que foram seqüenciados mais de uma vez, com o(s) oligonucleotídeo(s) indicados;

**?** – fragmentos cujas seqüências não puderam ser interpretadas.

## **ANEXO VI**

**Anexo 6:** Sequência nucleotídica completa do cDNA *EgrMAPK2*. Sequências sombreadas representam as regiões codificadoras; em negrito, os sítios canônicos potenciais de processamento (*splicing*) do transcrito primário.

GTAAACGGAATCGCGACCCCCAAATCCTAGGGCTTTCTTTCTCTCTATTTCTACCACCACCATCACCACCACCGATGGACGGCGGGGCTCCTC  
AGCCCGGGGATACCGTCATGTCGGAGGGCGGCCCGGCGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCCGACAGAGGGCGAGCCGACGGGATCGA  
GAACATCCCGGCGACGCTCAGCCACGGGGCCGCTTCATCCAGTACAACATCTTCGGCAACATCTTCGAGGTCACCGCCAAGTACAAGCCCCC  
ATCATGCCATCGGCAAGGGCGCCTACGGCATCGTCTGCTCGGCTTTGAATTCGGAGACGAACGAGCAGCTGGCCATAAAGAAGATTGCCAATG  
CTTTCGATAACAAGATCGACGCGAAGAGGACCCTCCGTGAGATCAAGCTCCTCCGGACATGGACCATGAAAACGTTGTGGCAATTAGGGATAT  
TATTCACCAGCCACAGAGAGAGGTTTCAATGATGTTTATATTGCATATGAGCTTATGGACTGATCTGCATCAAATATTCTGTTCCAACCAA  
GCATTTGCTGAGGAGATTGTCAGTATTTTCTATATCAGATCTTGCAGGATTAATAACATACATTTCTGCAAAATGTTCTGCATAGAGACTTGA  
AGCCCAGCAATCTTCTCTAAATGCAAAATGGCATTTGAAAATATGTGATTTGGTCTAGCTCGTGTCACTTCTGAAACTGATTTATGACAGA  
ATATGTTGTACAAGATGGTACCGTGCACCAGAGCTATTGTTAAATTTCTCAGACTATACGGCAGCAATAGATGTTGTTGTTGTTAGGCTGTATC  
TTTATGGAACATAATGGATCGGAAACCCCTTGTTCCTGGCAGAGACCATGTGCAACAGCTGCGTTTGTGATGGAG**GT**AACTTTTATGAAGTTGA  
TCAGTTGTTGAACAGTCTCTTTGGAGAAATAGTTTCTTTCCATGTTGCTCGCTTGTATTTTTGGTTTCTCGCAAATTTTGGCCTTGGGAGCTC  
TTTTCTTTGTTGATTTGCTAATCTAAACCAAAAAAAGTCCACATTAAGATTTCTAGATAGGCATTTCTCTAATTTACACTCTTTCTTTCTG  
ACCATTAACATATTATGTTCTTACTGGAGACGGATTTGATCTAGCTCTGTAGAATTTATGATGTGACATCTGGTAGTTATCTGTTGTGAC  
TCG**CAG**CTGATTGGCACCCCATCAGAGGCAGAGTTGGGGTTCTTAAATGAAAATGCTAAGAAGTATATCAGACAGCTTCTCTGTACCGTCCGG  
AATCTTTCACTGAAAAGTTTCCCATGTCCACCCGCTTGCAATCGATCTCGTTGAGAAGATGTTAACGTTCCGATCCAGGCTGAGGCTCAGAG  
**T**CGCAAAAATGTTCTCTGATACTTTCCCTGTAAGCCATTTCTGCATGGGCTCTAATTTGCTTTCCTAATCTATCAGAGTCTCGTGTAAATTGACTG  
GGTCGGTTGCTGATGCAACTGTCATTGATATTGAAGAGGTAGATATTTGCACAGGGATTTGCTCAATTCCTCGTTTGGACTGTGTATGTTCTT  
CCATACCTGCATCTGCTTGCATTTCTTGTGTTGATTTCAATTTGTTTGAAGTTGGTAATGCTTTTAGGCTGTAATAATCTTCTGTCTATCTCAGGATCAGGTTATGCTAAGGTGTAGGATGATGCA  
TTCAATTTGTTTGAAGTTGGTAATGCTTTTAGGCTGTAATAATCTTCTGTCTATCTCAGGATCAGGTTATGCTAAGGTGTAGGATGATGCA  
AAAATAGTGGCTTGTATGTGAGCATCCGATAATGATCTGGTTATAGTTTGAAGACTCTTTTGTGCGTTAAAAGATGAGTCCGGAGTTATTTCC  
TACTTAATTTTCTGCTTTTGTACCGTGCATGAAGTTATTTACTTATGTTTATCAATTTGCTCGGTGATAAATTACTTAGGGTCCCTATCAT  
TTCAGAAGAAGTGAATCTTCAAAGATGTCTGCTCCTGCCCCGTCAGGTTAGTGTGTTGGCATGTGATTTGCCAAGTGGCCGAACAGACTG  
CCCCATTTTAACTTCCCTGAACTCTGGCAATGAACAATAAATGATGAGTAGAGAAAACAGGGTTCAAATGGAGGTTTCATGCAAGTCACTTTATC  
TCAATTTGCTTCTAACTGGTAGAATGCTTGAGAGAGATTTTCAATTTAAAAAAGCGAGACAACCACATTTGCATTCAATTTAATATGG  
AAACCGCATCTTCTAGTCTTATTTGGGTCATGTGCAAGAACAAGAGAGAATCCATGCTGATGGCTTGGCAAGTCACTTCTGGGTATGATTG  
GGGAGGTGACTTGTCTGTGCTCATCTTTGGCCAGTTTCTTGTCAATAATATGTTCTCAAGTTAGAATTGATTTTATCTGCTGAAAGTGC  
AGAACGTTAAGGGCTCATATGTCAGACATGGAACCTTAGGACCGGATTTGGGACATGAAATTTGCAAAGAACCATAATTTAGTTCCAATTAACCA  
CAAAAATGTTAATCCAAAATTTTGTCTCTTACATTTGAAGTCAATATTTCATGGAACTTGACAATTATAAAAAGATATACTCCAAGA  
ATGTCAAAGCTTCTATTTATGCAATCCGATACCAATCTTGTGATGATGATGTCAGCTCGGTTCAAAGCACTGTGAATGTGTCAGTCTAACAGCA  
GTGTAAGCAGTCTATCAACCTAATATAGACATGTGGGGTTGGACATTTCAAATAAACATAAATATAGACATCACTATAGTGAATTTTATGCTAC  
AGAATGCATAAGTTAGATTAGTCAATTTATGATAGTCACTAGCGTAGTAAACACTACAGAATGCATAAGTTAATTTATATGCCTGAGAGAATGT  
CATGTTGCAACTCATATGTGTATGTACAGAGGTAGAGAAAATACCGCTCCAATCCACAACCTTGAAGTCACTTCTTTCAATTTTGAATAGGA  
GCACGAAAGCATAGTATTTCACTTGATCTGTCCAAAATAAAGCATGATTTATATTGCCACCAAAAATCAAATTAGAAATTTAATTTAATTTGC  
TTTTAACTTCCATGCTTCTTAACTTTTGGTATAAGCTTGTCCATCTTAAGACCACACCGTCAAGACTCCAGGAGCAGGAGCCAGGAGCCT  
GGAGCTGTCTCCAGAAATTTAACTTCAACCATCTTAGTCTCATCAAAGCAAAAAGTAGTAGCCACCATTTGCAGACATAGATGGTCAAATCT  
TAGTGAAGAGATAATGATCTTGTATGCCTCTACAGCTGGTCTGTTTCTGTTTGGATGGCCAGTGAAGTCAAGAACTCATGACTGGCTGGAG  
AGATGTTCTGAAAAGTTGTGCAATTAACATCATGTGGAACATGTGATTTGAAAAGGAAAGATAATCCCTGATTTATCTACATTTTATACA  
CCTGTTTAGGACTGAACCTTTCAATTAAGTCTCGGCTCAGCTTTTCTGAAGCTTATGGCTGAATCCACAAAAGTTTCTTTTCTCGGAGTCCCT  
TCAGTGCATTTCTGTGAGCTTGGATTTGACTCCTTCCGACAGCAAGCTCTATTGTTGAAAAGATAGAAAAGATACTGAAATATGATGATGAC  
TTAGATCCTATCATATAAATTTGCAAGGCTGTGATCCTATAGTGAAGTTTGTAGTCTGGAAGATTCTGTTGATTTAGAGACTGAGCTG  
AAGCGACTCATGCTGAAACTACTTCGGTATCCTATTTTCCATTTTCTTTTCCCTTTGATGGAGATTGGAATTTGAAGTTAAGCTTAAT  
CTAGTCAAGTGGGGTAAAGAAGAGTTTCTTGCAGCGTTTGTGAGGTTGATGATCCATCCTTAGTAAAGGAGAAGCCAATTTTGTGACCA  
TCTGCTGCTGTACATTTGTTCTGCTATGAGGGAAGCTATTGAACCTGTTAATATCACCATCGAGCTGTGCTGGGGTCTTTTCTGATTAAGAA  
AACCGATGCTTGAACCGCAGAAAATAAAGGAGGAGAAGTTACCTGATGTTGGACTTTTGTTCATATGGTAATTTGTTGGTACTAGGTTCCCAAG  
TTTGCAAAATAAATGATTTGGTATTTGGTAATTTGGCTTGTATATGCTGAAAATAAAAAAACCCTTGGCTTTTGTCAACACATGGGAGATG  
TGATGAGCATTAAAATATGCTTTTAAAGCATGAGTCAATGATTACAGCCCTTCTGAGAACATGAAAATTTATGCGTGTGTTTACGAGGCTGAAT  
CAGCTATCTCATGATGAATCAGGCTCGATTTAGGAAATGGTCTGCATATATGTTCTGCTCACTTCACTGATTTGTGGCGTTTATGCTTTTGTGAT  
TGGCCAAGGTAATGTGATCCTTGGCTGCTTTTTATACAGGGCCATTTAGATTATAGATTGCTTCTGGTGTAGGACAAAGGGATCTCGTAAA  
TTTTCTTCCATGTTTCCCAATAAATTAACCTTAGTGGTGTGCTGCTCGTACGGGAGACATTTCTGTTTCAATGAGATTTATCTCTTAACAT  
TTAGTTTCTTTGGTA**CAG**TTGAAGAGGCATTGGCTCATCCCTACCTAAACTCACTGCACGACATCAGCGATGAGCCGACTTGCATGAATCCATT  
CAACTTCGACTTTGAGCAGCATGCACTCAGGAGGAACAGATGAGGGAGTTAATTTATAGGGAAGCGCTTGCATTTAATCCCGAGTATCTACAG  
TAAATGGAGTCATGCTGTTAGTATTTGGTGGCTGTTCTTGTAGTGTGATGCCCGCTTTAACATGGCGATGATTTATTTCTTCATGTACATATG  
GTTTATCCTATTGTTGGATGGCTCTGCTATTGAATCTTTTCTGACTTCGAGAACCATAAGAATTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAA