

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**JAMILLE SANTOS DA SILVA**

**Acúmulo diferencial de prolina em mutantes e transgênicos hormonais de  
tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) sob seca e estresse  
osmótico: papel do ácido jasmônico e sua interação com ácido abscísico**

**Piracicaba**

**2014**



**JAMILLE SANTOS DA SILVA**

**Acúmulo diferencial de prolina em mutantes e transgênicos hormonais de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) sob seca e estresse osmótico: papel do ácido jasmônico e sua interação com ácido abscísico**

**Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Lázaro Eustáquio Pereira Peres**

**Piracicaba**

**2014**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Silva, Jamille Santos da

Acúmulo diferencial de prolina em mutantes e transgênicos hormonais de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) sob seca e estresse osmótico: papel do ácido jasmônico e sua interação com ácido abscísico / Jamille Santos da Silva; orientador Lázaro Eustáquio Pereira Peres. - - Piracicaba, 2014.

92 p.: il.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Aminoácidos 2. Balanço hídrico 3. Hormônios vegetais 4. Mutação vegetal 5. Tomate I. Título

CDU 577.175.1 : 635.64

*Aos meus pais Lucineide e Jasiel, por  
todo amor, exemplo e incentivo*

**Dedico**

*Ao meu irmão Raphael por todo  
amor e apoio*

**Ofereço**



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelo sonho realizado.

Ao CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura), pela oportunidade de cursar um curso de mestrado de excelência.

Ao Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres, pela orientação, disponibilidade e apoio.

Ao Prof. Dr. Victor Alexandre Vitorello pela orientação, confiança, ensinamentos, pelos incentivos.

Ao Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira, pela receptividade e disponibilidade de seu laboratório e técnicos para a realização de meus experimentos.

A CAPES (Coordenação de Apoio e Pesquisa do Ensino Superior), pela concessão da bolsa de metrado.

À técnica de laboratório Mariana pela ajuda concedida na realização de minhas atividades.

Aos amigos de Laboratório (Fabiana, Jonathas, Lucas, Naiara, Rodrigo e Sabrina) pela disposição em me ajudar, apoio, incentivo, ensinamentos e amizade durante a realização do mestrado.

Aos meus pais, Lucineide e Jasiel pelo amor incondicional, incentivo, apoio, esforço e dedicação a mim e aos meus estudos durante toda minha vida.

A toda minha família pelo apoio e incentivo.

Às minhas queridas amigas (Fabiana Rodrigues, Maria Emília, Rachel Hellen e Zirlane Portugal) pela linda amizade, e que mesmo com à distância permanece sempre no meu coração.

À minha amiga Nayara Roberto, pela convivência maravilhosa e pelo incentivo durante o mestrado.

À todos os amigos de pós-graduação que conheci em Piracicaba, que fizeram maiss alegres meus dois anos curso.





*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória nem derrota”*

**Theodore Roosevelt**



## RESUMO

SILVA, J. S. **Acúmulo diferencial de prolina em mutantes e transgênicos hormonais de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) sob seca e estresse osmótico: papel do ácido jasmônico e sua interação com ácido abscísico.** 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

O déficit hídrico, que tem como componente principal o estresse osmótico, é o principal fator que limita a produção vegetal. O acúmulo de prolina é uma das respostas mais características a esse estresse, mas sua função, bem como a regulação da sua acumulação, não está bem estabelecida. No presente estudo, testou-se a hipótese que hormônios exercem um controle diferencial sobre a expressão dos genes e nas atividades das diferentes enzimas envolvidas na síntese e degradação da prolina sob déficit hídrico e estresse osmótico. Visando entender este controle, mutantes e transgênicos hormonais da cultivar Micro-Tom (MT) de tomateiro foram examinados quanto a possíveis alterações no acúmulo de prolina. Todos os experimentos foram realizados em condições ambientais controladas ( $\cong 350 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $28\pm 2/24\pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 h). Genótipos de MT com aproximadamente 20 dias após a germinação (DAG) foram submetidos ao déficit hídrico através da suspensão de rega por até oito dias. Alguns genótipos responderam diferencialmente quanto ao acúmulo de prolina, mas também houve diferenças no decréscimo de  $\Psi_w$  do substrato com a secagem. Portanto, os genótipos que apresentaram acúmulo diferenciado de prolina no experimento com seca foram submetidos a PEG-6000 em solução nutritiva, sob dois potenciais hídricos (-0,8 e -1,2 MPa), por 12, 24 e 36 h. O uso de PEG foi importante, pois permitiu expor os materiais simultaneamente a um mesmo potencial hídrico. Alguns mutantes apresentaram resposta diferenciada e, dentre eles, verificou-se que o transgênico *35S::PS*, com níveis elevados de prosistemina (PS), foi mais resistente ao estresse osmótico. Sabe-se que a PS leva a um acúmulo elevado de ácido jasmônico (JA), assim como evidências sugerem a participação do JA no acúmulo de prolina, mas pouco se sabe sobre o papel de ambos neste acúmulo. Para examinar se há diferenças no papel da PS e do JA no acúmulo de prolina, foi realizado um experimento a -1,2 MPa com o transgênico *35S::PS* e MT com aplicação exógena de metil jasmonato (MeJa). Em ambos os casos, houve indução da P5CS (via de síntese) e da enzima P5CDH (via de degradação) em condições controle, porém não houve acúmulo de prolina. Já sob estresse osmótico, foi observado um aumento adicional da atividade das enzimas de síntese e uma acentuada repressão da P5CDH. Assim, o MeJa parece promover um elevado “turnover” de prolina em condições controle, sem promover seu acúmulo, mas com a imposição de estresse osmótico a via de degradação parece ser acentuadamente reprimida causando o acúmulo deste aminoácido. Para examinar a dependência de MeJa por ABA no acúmulo de prolina, o mutante *sitiens*, deficiente em ABA, foi submetido ao estresse osmótico juntamente com a aplicação exógena de MeJa, ABA e MeJa + ABA. No mutante *sitiens*, a manutenção de um  $\Psi_w$  mais elevado e próximo do controle (MT) foi dependente de ABA, mas não de MeJa. O teor de prolina aumentou moderadamente na presença de MeJa ou ABA, sob estresse osmótico, mas foi acentuado na presença dos dois hormônios, sugerindo algum grau de interdependência na ação destes hormônios no acúmulo de prolina.

Palavras-chave: Prolina. Ácido Jasmônico. Estresse osmótico. P5CDH.



## ABSTRACT

SILVA, J. S. **Differential accumulation of proline in hormonal mutants and transgenic of tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) under drought and osmotic stress: Role of jasmonic acid and its interaction with ABA.** 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Drought, which has as its main component osmotic stress, is the major factor limiting crop production. The accumulation of proline is one of the most characteristic responses to this stress, but its function as well as the regulation of its accumulation is not well established. In this study, we tested the hypothesis that hormones exert control over the differential expression of genes and the activity of enzymes involved in the synthesis and degradation of proline under drought and osmotic stress. To understand this control, hormonal mutants and transgenic lines of the Micro-Tom (MT) cultivar of tomato were examined for possible changes in the accumulation of proline. All experiments were conducted under controlled environmental conditions ( $\cong 350 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $28\pm 2/24\pm 2$  °C and a photoperiod of 16 h). Plants of MT genotypes, approximately 20 days after germination (DAG), were subjected to drought via suspension of irrigation for up to eight days. Some genotypes responded differentially with respect to proline accumulation, but there were differences in the decrease of  $\Psi_w$  of the substrate with drying. Therefore, the genotypes that showed different levels of proline in the experiment with drought were treated with PEG-6000 in nutrient solution at two different water potentials (-0.8 and -1.2 MPa) for 12, 24 and 36 h. The use of PEG was important because it allowed simultaneous exposure to the same water potential. Some mutants displayed a differential response, and, among them, the transgenic line *35S::PS*, with high levels of prosystemin (PS), was more resistant to osmotic stress. It is known that PS leads to increased accumulation of jasmonic acid (JA), and evidence suggests the involvement of JA in proline accumulation, but little is known about the role of either in this accumulation. To examine whether there are differences in the role of PS and JA in the accumulation of proline, an experiment at -1.2 MPa with *35S::PS* and MT with exogenous application of methyl jasmonate (MeJa) was performed. In both cases there was induction of the enzyme P5CS (synthesis) and P5CDH (degradation) under control conditions, but without accumulation of proline. However, under osmotic stress, a further increase in the activity of synthesis enzymes and a marked suppression of P5CDH were observed. Thus, MeJa seems to promote a high "turnover" rate of proline under control conditions, without promoting its accumulation, but upon the application of osmotic stress, its degradation appears to be markedly suppressed, resulting in the accumulation of this amino acid. To examine the dependence of MeJa on ABA for the accumulation of proline, the *sitiens* mutant (deficient in ABA) was subjected to osmotic stress along with exogenous application of MeJa, ABA and ABA + MeJa. In *sitiens*, maintenance of a higher  $\Psi_w$ , closer to MT, was dependent on ABA, but not MeJa. The proline content increased moderately in the presence of MeJa or ABA under osmotic stress, but was pronounced in the presence of both hormones, suggesting some degree of interdependence in the role of these hormones in the accumulation of proline.

Keywords: Proline. Jasmonic acid. Osmotic stress. P5CDH.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AB	2-aminobenzaldeído
ABA	ácido abscísico
BR	brassinosteróide
BSA	albumina bovina sérica
CRA	conteúdo relativo de água
DTT	dithiothreitol
E	transpiração
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	espécies reativas de oxigênio
GA	giberelina
<i>g<sub>s</sub></i>	condutância estomática
GSA	semialdeído glutâmico
JA	ácido jasmônico
MeJa	metil jasmonato
MT	Micro-Tom
<i>nptII</i>	neomicina fosfotransferase II
P5C	$\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato
P5CDH	desidrogenase de P5C
P5CR	P5C redutase
P5CS	sintase de P5C
PDH	prolina desidrogenase
PEG	polietileno glicol
PVPP	polivinil polipirrolidona
SA	ácido salicílico
$\epsilon$	coeficiente de extinção molar
$\Psi_w$	potencial hídrico





## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	20
2.1. Déficit hídrico e estresse osmótico .....	20
2.2. Mutantes e transgênicos de tomateiro Micro-Tom como ferramenta experimental.....	23
2.3. Acúmulo de prolina sob déficit hídrico e osmótico .....	25
2.4. Regulação do acúmulo de prolina por hormônios vegetais .....	29
<b>3. HIPÓTESE E OBJETIVO</b> .....	32
3.1. Hipótese .....	32
3.2. Objetivo geral .....	32
3.3. Objetivos específicos .....	32
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
4.1. Material vegetal e condução das plantas .....	33
4.2. Abordagem experimental e experimentos.....	33
4.2.1. Experimento 1 - Caracterização da resposta da cultivar Micro-Tom ao déficit hídrico por suspensão de rega .....	33
4.2.2. Experimento 2 - Seleção de mutantes e linhagens transgênicas hormonais com acúmulo diferencial de prolina sob déficit hídrico por suspensão de rega .....	34
4.2.3. Experimento 3 - Caracterização do acúmulo de prolina em mutantes e linhagens transgênicas hormonais sob estresse osmótico induzido por PEG a diferentes valores de $\Psi_w$ ....	37
4.2.4. Experimento 4 - Papel do ácido jasmônico na resposta de 35S::PS ao estresse osmótico e acúmulo de prolina.....	38
4.2.5. Experimento 5 - Papel do JA e sua dependência de ABA no acúmulo de prolina e na regulação enzimática do metabolismo de prolina em mutantes defectivos em ABA sob estresse osmótico .....	38
4.3. Condutância estomática ( $g_s$ ) e transpiração (E) .....	39
4.4. Conteúdo relativo de água.....	39
4.5. Potencial hídrico foliar.....	40
4.6. Vazamento de eletrólitos (dano de membrana) .....	40
4.7. Conteúdo de prolina.....	40
4.8. Extração e ensaios enzimáticos .....	41
4.8.1. Determinação de proteínas solúveis.....	41
4.8.2. Síntese de $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5C).....	41
4.8.3. Sintetase do $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5CS; EC 1.5.1.12) .....	42
4.8.4. Redutase do $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5CR; EC 1.5.1.2) .....	43
4.8.5. Ornitina aminotransferase (OAT; EC 2.6.1.13).....	43

4.8.6. Desidrogenase do $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5CDH; EC 1.5.1.12) .....	44
4.9. Análise estatística .....	44
5. RESULTADOS .....	45
5.1. Caracterização da cultivar Micro-Tom sob déficit hídrico .....	45
5.2. Acúmulo de prolina em mutantes e linhagens transgênicas hormonais de Micro-Tom sob déficit hídrico .....	47
5.3. Acúmulo de prolina em mutantes e linhagens transgênicas hormonais de Micro-Tom submetidos a um estresse osmótico severo .....	51
5.4. Acúmulo de prolina em mutantes e linhagens transgênicas hormonais de Micro-Tom submetidos a um estresse osmótico moderado .....	54
5.5. Ação da prosistemina e do ácido jasmônico no acúmulo e nas atividades das enzimas de biossíntese e degradação da prolina .....	55
5.6. Dependência do MeJa por ABA no acúmulo e nas atividades das enzimas de biossíntese e catabolismo da prolina .....	59
6. DISCUSSÃO .....	63
6.1. O acúmulo de prolina é bem correlacionado com o potencial hídrico foliar e com o conteúdo relativo de água em Micro-Tom sob déficit hídrico .....	63
6.2. Genótipos hormonais sob déficit hídrico respondem diferencialmente quanto ao acúmulo de prolina .....	64
6.3. Sistemina e ácido jasmônico estimulam o turnover de prolina em condições controle e aumentam o seu acúmulo com o estresse osmótico por inibição da sua degradação .....	67
6.4. A ação de ácido jasmônico sobre o $\Psi_w$ foliar é dependente de ABA enquanto que sua ação sobre o acúmulo de prolina é parcialmente dependente .....	70
7. CONCLUSÕES .....	73
REFERÊNCIAS .....	75
APÊNDICES .....	89

## 1. INTRODUÇÃO

Seca, alta salinidade e congelamento podem ocasionar estresse osmótico em plantas. Entre eles, a seca é o estresse ambiental mais importante na agricultura e muitos esforços têm sido feitos para melhorar a produtividade das culturas sob condições limitantes de água (CATTIVELLI et al., 2008). As plantas precisam manter o crescimento e a produtividade sob condições de estresse e para isto mecanismos de resistência específicos devem ser acionados.

Uma das respostas mais comuns ao estresse osmótico em plantas é a elevada produção de diferentes tipos de solutos orgânicos compatíveis (SERRAJ; SINCLAIR, 2002). Entre eles, o acúmulo de prolina em condições ambientais adversas parece ser o mais amplamente difundido em diferentes espécies vegetais. Considera-se que a prolina pode desempenhar um papel importante na resistência adquirida por plantas e diversas funções são atribuídas a este aminoácido. Além de seu papel como um osmoregulador, a prolina pode contribuir para estabilizar as estruturas celulares através de sua possível função de chaperona (HAMILTON; HECKATHORN, 2001; DIAMANT et al., 2001), eliminar radicais livres (SMIRNOFF; CUMBES, 1989; RADYUKINA et al., 2008), manter relações adequadas de  $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$  sob condições de estresse (SHARMA; VILLAMOR; VERSLUES, 2011) e funcionar como uma reserva temporária de N (ROCHA et al., 2012).

A função exercida pela prolina no metabolismo vegetal também parece ser dependente das condições ambientais em que as plantas são submetidas. No entanto, grande parte dos trabalhos mostram somente evidências dessas funções, mas nenhuma delas tem aceitação universal na literatura. Além das inúmeras funções relacionadas à prolina, outra problemática é a complexidade da regulação do seu metabolismo. O acúmulo de prolina dentro da célula é um resultado do balanço de suas vias de síntese e degradação. Sob estresse osmótico, as vias de síntese são ativadas, enquanto que as vias de degradação são resprimidas, resultando na elevação do conteúdo desta molécula na célula (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010).

Muitos fatores e moléculas que podem controlar o acúmulo de prolina ainda permanecem desconhecidos. Porém, sabe-se que hormônios vegetais regulam diversas respostas durante o desenvolvimento da planta, assim como na proteção contra diferentes estresses (BOSTOCK, 2005; MAUCH-MANI; MAUCH, 2005) e também devem regular o acúmulo de prolina (SHAKIROVA et al., 2003; SU et al., 2011). Níveis elevados de hormônios, ocasionados pela aplicação exógena, ou a ausência deles nas plantas por mutação pode induzir ou reprimir o acúmulo de prolina, sob condições específicas (THOMAS;

MCELWAIN; BOHNERT, 1992; CHEN; KAO, 1993; YOSHIBA et al., 1995; SHAKIROVA et al., 2003).

O ácido abscísico (ABA) é sintetizado nos plastídeos e pode ser acumulado em toda a planta. Este hormônio desempenha um papel chave em inúmeras respostas a estímulos ambientais, muitas ainda desconhecidas, principalmente em processos associados à desidratação, assim como o estresse osmótico. A aplicação de ABA exógeno é, inclusive, muitas vezes utilizada para imitar respostas de desidratação (BARTELS; SOUR, 2004). Geralmente se aceita que vias tanto ABA-dependentes e ABA-independentes estão envolvidas no acúmulo de prolina (CHIANG; DANDEKAR, 1995; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997; HARE et al., 1999; ZHU, 2002). Em tomateiro, o acúmulo de prolina parece ser independente de ABA (STEWART; VOETBERG, 1987), diferenciando este modelo vegetal da maioria das espécies que parecem acumular prolina por mecanismos dependentes de ABA (NAMBARA et al., 1998; VERSLUES; BRAY, 2006).

Além do ABA, outros hormônios parecem estar relacionados a processos moleculares em resposta ao estresse osmótico, assim como o acúmulo de prolina. Ácido jasmônico, citocininas, ácido salicílico, etileno e brassinosteróides são hormônios que são relatados na literatura como promotores ou inibidores do acúmulo de prolina (THOMAS; MCELWAIN; BOHNERT, 1992; SHAKIROVA et al., 2003; SU et al., 2011; ABRAHAM et al., 2003; ALVAREZ; TOMARO; BENAVIDES, 2003). Apesar disto, poucos trabalhos têm relacionado a ação de todos os hormônios com a acumulação de prolina e mais escassos ainda são os que mostram a regulação das vias metabólicas.

Estudos com hormônios vegetais podem ser de extrema dificuldade, dado as pequenas concentrações que estes são encontrados nos tecidos vegetais, fazendo com que as técnicas para suas dosagens sejam extremamente caras e trabalhosas e muitas vezes as correlações entre um nível endógeno com um efeito fisiológico não necessariamente significa uma relação causa e efeito. Já o uso de inibidores pode causar disfunção do metabolismo, já que estes geralmente não são específicos. Porém, a utilização de mutantes e plantas transgênicas não necessita de dosagem de hormônios ou de inibidores, pois uma alteração permanente nas vias de síntese ou degradação destes hormônios ocasiona alteração nos níveis do hormônio, podendo se estabelecer correlações entre variáveis sem a influência de efeitos secundários.

Assim, a despeito da imensa quantidade de trabalhos publicados sobre o metabolismo de prolina em variadas espécies vegetais (LUTTS et al., 1999; GOMES et al., 2010; SANKAR et al., 2007; ROCHA et al., 2012), diversos aspectos permanecem não esclarecidos. Um destes aspectos é elucidar mecanismos de controle hormonal no metabolismo de prolina.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de testar a hipótese que diferentes hormônios podem modificar o acúmulo de prolina, através do controle das vias de biossíntese e degradação da prolina por mecanismos dependentes ou independentes de ABA, em folhas de mutantes e transgênicos hormonais de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Déficit hídrico e estresse osmótico

Diversos fatores abióticos causam extensas perdas na produção da agricultura mundial (BOYER, 1982). Entre todos, a seca é o principal fator abiótico que limita a produção vegetal. Há uma grande variabilidade no suprimento hídrico, podendo esta ocorrer em períodos diferentes durante o crescimento e desenvolvimento das culturas e seus efeitos podem ser muito específicos (LAWLOR, 2013). No entanto, há uma forte dependência do suprimento hídrico nos processos fisiológicos vegetais durante o crescimento e a produção (CHAVES et al., 2003).

As plantas experimentam o déficit hídrico quando a taxa de transpiração torna-se elevada ou quando o suprimento de água nas raízes é limitado (REDDY; CHAITANYA; VIVEKANANDAN, 2004). A deficiência hídrica pode ser induzida pela escassez de água no solo como também por excesso de solutos na solução do solo, acarretando o estresse osmótico (BOHNERT; SU; SHEN, 1999). Em condições naturais, a salinidade e o déficit hídrico são as principais causas do estresse osmótico em plantas, resultando na interrupção da homeostase osmótica e iônica nas células (SERRANO et al., 1999; ZHU, 2001).

O estresse osmótico nas plantas pode ser imposto através de mudanças significativas nos potenciais hídricos do ambiente. Existem diferentes métodos utilizados para impor este tipo de estresse, objetivando a análise das respostas das plantas (VERSLUES et al., 2006). Experimentos de secagem do solo utilizando plantas cultivadas em vaso são tipicamente feitos através da suspensão de rega. Tais experimentos podem parecer, à primeira vista, bastante simples, mas muitas vezes acabam sendo mais difíceis para interpretar (VERSLUES et al., 2006).

Para estudos genéticos, onde uma planta mutante ou transgênica está sendo comparada com o tipo selvagem, a forma mais fácil de assegurar uma comparação válida é crescer a planta do tipo selvagem no mesmo vaso com o genótipo sob avaliação. Assim, as raízes de ambos os genótipos irão crescer no mesmo solo e serão expostas ao mesmo  $\Psi_w$ , mesmo que um genótipo utilize a água mais rapidamente do que o outro (VERSLUES et al., 2006). Na teoria, isto é válido, no entanto, diferenças na transpiração são particulares de cada genótipo, resultando na modificação do potencial hídrico entre vasos, na comparação de inúmeros genótipos.

Em muitos estudos são utilizados solutos para reduzir o  $\Psi_w$  de um meio de crescimento de plantas. Nesta abordagem, o  $\Psi_w$  pode ser controlado com precisão e de forma reprodutível. O tratamento osmótico, no entanto, também pode ter seus problemas potenciais. Experimentalmente, um tratamento de baixo  $\Psi_w$  pode ser aplicado usando soluções contendo um soluto de alto peso molecular. Polietileno glicol (PEG) com peso molecular acima de 6000 não consegue entrar nos poros da parede celular de raízes (CARPITA et al., 1979; OERTLI, 1985). Desta maneira, o PEG é o melhor soluto para imposição de um estresse de baixo  $\Psi_w$  equivalente ao estresse imposto por seca (VERSLUES; BRAY, 2004; VAN DER WEELE et al., 2000).

As plantas apresentam uma ampla gama de respostas a níveis moleculares, celulares e fisiológicos após a exposição ao déficit hídrico e ao estresse osmótico (BOHNERT; SU; SHEN, 1999; HASEGAWA et al., 2000). Embora os efeitos gerais do déficit hídrico sobre o crescimento das plantas sejam bastante conhecidos, os efeitos primários deste estresse, ao nível bioquímico e molecular não, são bem compreendidos (ZHU, 2002; CHAITANYA et al., 2003; CHAVES et al., 2003).

É conhecido que a taxa fotossintética de plantas superiores diminui com a diminuição do conteúdo relativo de água (CRA) e do potencial hídrico foliar (LAWLOR; CORNIC, 2002). A limitação da fotossíntese sob déficit hídrico é um fenômeno mais complexo do que a simples limitação estomática. Alterações no metabolismo celular do carbono podem ocorrer no início do processo de desidratação. Déficit hídrico em geral reduz a capacidade das células para assimilação do carbono.

A reduzida atividade do fotossistema II (PSII), durante o déficit hídrico, resulta em um desequilíbrio entre a geração e utilização de elétrons, resultando em mudanças no rendimento quântico. Estas mudanças na fotoquímica dos cloroplastos das folhas de plantas sob déficit hídrico resulta na dissipação do excesso de energia da luz no núcleo do PSII e do complexo antena. Desta maneira, há geração de espécies reativas de oxigênio ( $O_2^-$ ,  $^1O_2$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^*$ ), que são potencialmente perigosas sob condições de estresse (PELTZER et al., 2002).

Efeitos deletérios dos radicais livres sobre as estruturas biológicas incluem degradação do DNA, aminoácidos e peroxidação e oxidação de proteínas e lipídios (ASADA, 1999; JOHNSON et al., 2003). Espécies reativas de oxigênio (EROs) atacam as macromoléculas biológicas mais sensíveis nas células prejudicando suas funções. Os alvos danificados são recuperados por meio de reparação ou substituição via biossíntese *de novo*. No entanto, sob condições de estresse severo e devido às moléculas-alvo estarem fortemente danificadas, pode ocorrer uma cascata de eventos simultâneos, resultando na morte celular.

Muitas plantas e outros organismos enfrentam estresse osmótico sintetizando e acumulando alguns solutos compatíveis, que são denominados como osmoprotetores ou osmólitos. Estes compostos são moléculas pequenas, eletricamente neutras, que não são tóxicas mesmo em concentrações molares (ALONSO et al., 2001). Estes incluem aminoácidos, polióis, amônio quaternário e compostos sulfônicos terciários. O acúmulo destes solutos compatíveis teria a função de diminuir o potencial osmótico interno e prevenir a perda de água dos tecidos vegetais (MORGAN, 1984; MUNNS, 1988).

As plantas respondem ao déficit hídrico e aclimatam-se a condições de seca por várias alterações fisiológicas, bioquímicas, anatômicas e morfológicas, incluindo alterações na expressão gênica. As plantas também possuem diferentes tipos de estratégias de vida para enfrentar e resistir a estresse hídrico.

Segundo Levitt (1980), a resistência da planta em condições de déficit hídrico é dividida em escape, estratégias de tolerar e evitar. Porém, estas estratégias podem ser combinadas em uma variação de tipos de respostas (LUDLOW, 1989). Plantas que apresentam mecanismos de escape apresentam alta plasticidade no desenvolvimento, sendo capaz de completar seu ciclo de vida antes do déficit hídrico ocorrer (LEVITT, 1980). No entanto, as plantas também podem resistir a condições de seca ao evitar a desidratação do tecido, enquanto mantém o potencial hídrico do tecido tão alto quanto possível ou pela tolerância a potenciais hídricos mais baixos.

A modificação de plantas para uma maior resistência baseia-se principalmente na manipulação de genes que protegem e mantêm a função e a estrutura de componentes celulares. Em contraste com a maioria das características monogênicas de resistência projetada para pragas e herbicidas, as respostas geneticamente complexas a condições de estresses abióticos são mais difíceis de controlar (WANG; VINOCUR; ALTMAN, 2003).

Estratégias de engenharia genética utilizam da transferência de um ou vários genes que estão envolvidos na sinalização e nas vias de regulação, ou que codificam enzimas presentes em vias que conduzem à síntese de protetores funcionais e estruturais, tais como osmólitos e antioxidantes, ou que codificam proteínas que conferem tolerância. Os atuais esforços para melhorar a resistência ao estresse por transformação genética resultaram em conquistas importantes, no entanto, a natureza dos mecanismos complexos de resistência ao estresse abiótico, e os potenciais efeitos colaterais prejudiciais, fazem esta tarefa extremamente difícil (WANG; VINOCUR; ALTMAN, 2003).



## 2.2. Mutantes e transgênicos de tomateiro Micro-Tom como ferramenta experimental

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma planta modelo para o estudo de espécies de *Solanaceae*. Este apresenta um genoma relativamente pequeno com 950 Mb e organizado de forma conservada, apresentando um elevado nível de sintenia de genes com as outras Solanáceas (RICK; YODER, 1988; HILLE et al., 1989; TANKSLEY, 2004). Seu genoma foi sequenciado pelo "International Solanaceae Genome Project" (SOL) (MUELLER et al., 2009).

A variedade de mutantes disponíveis é outra característica vantajosa do tomateiro, incluindo inúmeras mutações hormonais (EMMANUEL; LEVY, 2002). No entanto, estas mutações estão distribuídas em várias origens genéticas, incluindo cultivares, híbridos e espécies selvagens, dificultando estudos comparativos (CARVALHO et al., 2011).

A cultivar de tomateiro Micro-Tom (MT) foi produzida para fins ornamentais pelo cruzamento de duas cultivares Flórida Basket e Ohio 4013 -3. A cv MT exibe um fenótipo anão acentuado com pequenos frutos vermelhos (SCOTT; HARBAUGH, 1989). Seu pequeno tamanho, rápido crescimento e fácil transformação levaram à sua proposta como um sistema modelo conveniente para a análise da regulação do desenvolvimento de frutos carnosos (especialmente do tipo baga) e posteriormente para outros tipos de pesquisa (EMMANUEL; LEVY, 2002).

O fenótipo anão de plantas MT é devido a pelo menos três mutações. Duas mutações, uma no locus *sp* (produzindo um fenótipo de crescimento determinado) e outra no *d* (reduzindo comprimento dos entrenós e produção menor, folhas rugosas e verde-escuras, como resultado da redução do conteúdo de BR), são caracterizadas. Além disso, o MT possui outra mutação (*mnt*), que ainda é descaracterizada e que não afeta o metabolismo de giberelina (GA), mas que é provável estar associada com a sinalização de GA (MEISSNER et al., 1997). Diversas linhas de evidência apoiam o fato de que o MT é um mutante deficiente em BR (BISHOP et al., 1996).

Dentro da cultivar MT, existem inúmeros mutantes de valiosa importância para a compreensão do desenvolvimento das plantas e a sua interação com o ambiente. Os mutantes e transgênicos existentes em outros backgrounds são introduzidos em MT através de introgressão. Esta consiste em uma série de sucessivos retrocruzamentos até a geração BC6, quando, pelo menos, 99% do genoma das plantas obtidas corresponde ao MT. A introgressão de mutações previamente conhecidas e a mutagênese do próprio MT contribuíram para que

hoje sejam disponíveis mutantes afetando pigmentos, resposta fotomorfogênicas, formato e cores de diversos órgãos, além de mutantes hormonais ([www.esalq.usp.br/tomato](http://www.esalq.usp.br/tomato)).

O uso de mutantes como ferramenta para estudos com hormônios é de extrema importância, já que estas moléculas regulam inúmeros processos na célula vegetal (BARI; JONES, 2009; DAVIES, 2010; ROBERT-SEILANIANTZ; GRANT; JONES, 2011). Elas participam da regulação de inúmeras etapas do desenvolvimento vegetal, assim como a regulação de processos vegetais relacionados com ambiente. A utilização de mutantes deficientes e/ ou insensíveis de hormônios vegetais tem sido de importância inestimável para o entendimento dos mecanismos moleculares de ABA, auxinas, etileno, GA e de outros hormônios (ESTELLE; KLEE, 1994; FINKELSTEIN; ZEEVART, 1994; ECKER, 1995).

Mutantes hormonais deficientes geralmente resultam de lesões nos genes que codificam enzimas biossintéticas hormonais e são identificados quando o fenótipo do tipo selvagem é recuperado após a aplicação do hormônio exógeno. Já mutantes hormonais insensíveis podem apresentar o mesmo fenótipo do mutante deficiente, mas não são recuperados por um tratamento hormonal exógeno. Estes resultam de lesões em genes que codificam o receptor do hormônio ou dos elementos da via de transdução de sinal (CLOUSE; LANGFORD; MCMORRIS, 1996).

Além do uso de mutantes, a transformação genética é uma tecnologia-chave para a genômica funcional. Ela é de grande utilidade para a confirmação das funções de genes isolados através da clonagem. Diversos tipos de transformantes hormonais, superexpressando uma enzima de síntese ou da degradação de um hormônio, são encontrados. Vários estudos foram realizados com o objetivo de produzir protocolos eficientes para a transformação mediada por *Agrobacterium*, pois este é um trabalho laborioso e que muitas vezes não se tem o objetivo alcançado. No entanto, eficiências de transformação variando entre 20 e 56% foram obtidas para a cultivar de tomateiro MT (DAN et al., 2006; QIU et al., 2007; SUN et al., 2006).

Assim, o uso de mutantes e transgênicos hormonais de MT no estudo do acúmulo de prolina reside no maior potencial que existe para se estabelecer relações causais entre as variáveis examinadas. Em estratégias de pesquisa mais convencionais, as correlações são feitas entre variáveis em função de diferenças na intensidade do estresse aplicado, seja por tempo ou dose. Já em estratégias que utilizam mutantes e transgênicos hormonais, o estresse e seus efeitos secundários não são alterados, mas apenas os processos sob controle de cada hormônio (e seus efeitos secundários). Assim, esta estratégia tem maior potencial para determinar, por exemplo, quais enzimas exercem maior controle sobre a indução do acúmulo

de prolina. Ou ainda, examinar questões tais como se a prolina confere ou não resistência; ou se há mudanças no desempenho das plantas frente ao estresse nos mutantes com acúmulo de prolina alterado.

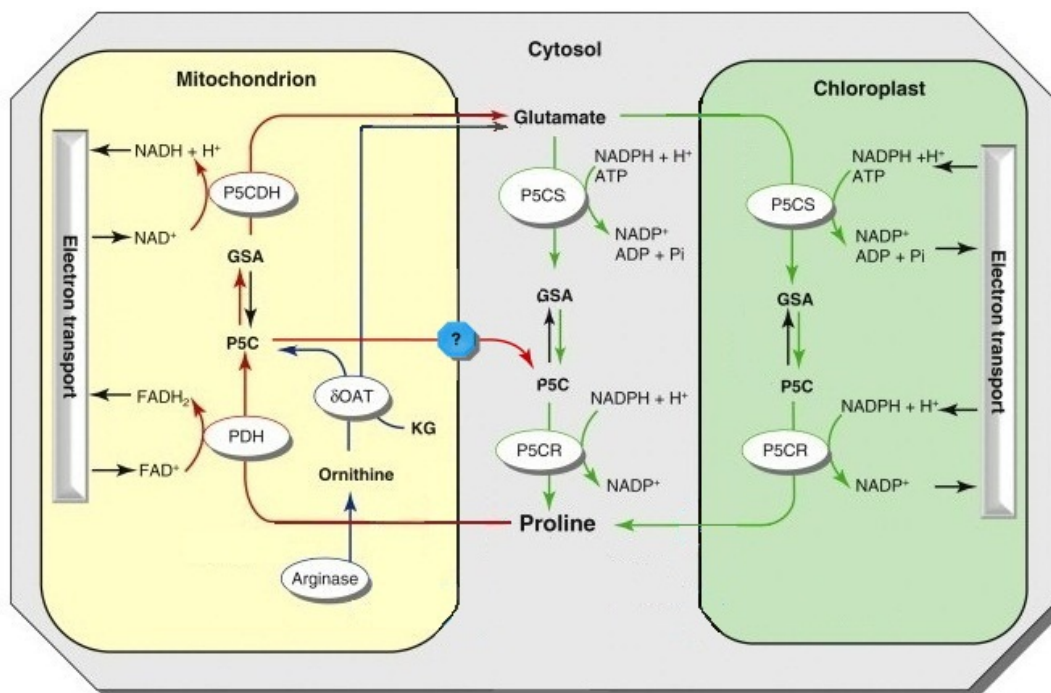
### 2.3. Acúmulo de prolina sob déficit hídrico e osmótico

Solutos compatíveis, ou osmólitos, se acumulam em organismos em resposta ao estresse osmótico. A função primária dos solutos compatíveis é manter o turgor celular e, assim, manter o gradiente de potencial hídrico que permitirá a absorção e condução de água na planta. Recentes estudos indicam que os solutos compatíveis também podem agir como removedores de radicais livres ou chaperonas químicas diretamente por estabilização das membranas e/ou proteínas (LEE et al., 1997; HARE et al., 1998; BOHNERT; SHEN, 1999; MCNEIL et al., 1999; DIAMANT et al., 2001). Estes solutos pertencem a três grupos principais: aminoácidos (por exemplo prolina), aminas quaternárias (por exemplo, glicina betaína, dimetilsulfoniopropionato) e polioli/açúcares (por exemplo, manitol, trealose).

Elevado acúmulo de solutos compatíveis em plantas transgênicas pode resultar em tolerância ao estresse (DE CAMPOS et al., 2011; VENDRUSCOLO et al., 2007). No entanto, a correlação entre o acúmulo de prolina, por exemplo, e a tolerância ao estresse abiótico em plantas nem sempre é aparente. Por exemplo, os níveis elevados de prolina pode ser característico de mutantes de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) com hipersensibilidade ao sal e ao frio (LIU; ZHU, 1997; XIN; BROWSE, 1998).

A prolina é sintetizada a partir de glutamato através dos intermediários semialdeído glutâmico (GSA) e  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5C), os quais ocorrem em equilíbrio químico entre si. A sintase do P5C (P5CS) catalisa a conversão de glutamato para P5C, seguido pela redutase do P5C (P5CR), que reduz o P5C a prolina (Figura 1). Na maioria das espécies de plantas, a P5CS é codificada por dois genes e a P5CR é codificada por um (VERBRUGGEN et al., 1993; STRIZHOV et al., 1997). Assim, existem dois loci no genoma nuclear de tomate especificando a P5CS e os clones de cDNA, *tomPRO1* e *tomPRO2*, foram isolados (FUJITA et al., 1998). *tomPRO1* se assemelha a um operon policistrônico procarioto, ao passo que *tomPRO2* codificou uma P5CS (FUJITA et al., 1998; GARCIA-RIOS et al., 1997). Estudos revelaram ainda que existe um aumento de três vezes nos níveis de mRNA de *tomPRO2*, enquanto que o mRNA de *tomPRO1* não foi detectado em resposta ao estresse salino (FUJITA et al., 1998).

No processo de degradação da prolina, esta é convertida a glutamato, via P5C e GSA através da desidrogenase da prolina (PDH) seguida pela desidrogenase do P5C (P5CDH) e este catabolismo ocorre na mitocôndria. PDH é codificada por dois genes, enquanto que um único gene para P5CDH foi identificado em *Arabidopsis* e tabaco (*Nicotiana tabacum*) (KIYOSUE et al., 1996; VERBRUGGEN et al., 1996; DEUSCHLE et al., 2001; RIBARITS et al., 2007). Como uma via alternativa, a prolina pode ser sintetizada a partir da ornitina, a qual é transaminada primeiro pela ornitina- $\delta$ -aminotransferase (OAT) e produzindo GSA/P5C, que é então convertido para prolina pela P5CR (DELAUNEY et al., 1993; ROOSENS et al., 1998).



**Figura 1 -** Vias de biossíntese e catabolismo de prolina. Glutamato é convertido a P5C pela P5CS (setas verdes) no citosol e no cloroplasto. Uma via alternativa ocorre na mitocôndria, onde P5C é sintetizado pela OAT (setas azuis). A conversão de P5C a prolina ocorre no citosol e no cloroplasto pela P5CR. A degradação é compartimentalizada na mitocôndria e é catalisada pela PDH e P5CDH (setas vermelhas) (Modificado a partir de Szabados e Sauvoré, 2010)

Embora o metabolismo da prolina tenha sido estudado a anos, pouco é conhecido sobre sua regulação e suas funções. Altas acumulações de prolina celular são resultantes do aumento da sua síntese, bem como na redução da sua degradação em resposta a uma variedade de condições de estresse, assim como salinidade e seca, que têm sido documentadas em muitas espécies de plantas (DELAUNEY; VERMA, 1993; KISHOR, 1988).

A complexidade da regulação do metabolismo da prolina e as múltiplas funções que são atribuídas a esta ilustram a importância e as dificuldades no melhoramento de plantas de interesse agrônomico pela modificação da expressão de genes envolvidos no seu metabolismo (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010).

Apesar da função do acúmulo de prolina estar frequentemente associada a uma ação osmoprotetora, há muita controvérsia a este respeito, tendo sido sugeridas diversas outras explicações para esta resposta. Alguns estudos têm atribuído características antioxidantes à prolina, sugerindo a atividade removedora de EROs (espécies reativas de oxigênio) (SMIRNOFF; CUMBES, 1989; RADYUKINA et al., 2008) e atuar com o mecanismo similar a chaperona molecular capaz de proteger a integridade de proteínas e manter as atividades de diferentes enzimas (HAMILTON; HECKATHORN, 2001; DIAMANT et al., 2001). Nos últimos anos, duas outras hipóteses têm acumulado evidências favoráveis. Em uma, o acúmulo de prolina seria resultante de desarranjos no metabolismo de N causado pelo estresse hídrico. A degradação de proteínas e o aumento consequente nos níveis de  $\text{NH}_3$  resultariam em alterações significativas na atividade de enzimas e vias envolvidas com a sua assimilação (ROCHA et al., 2012). Neste caso, a prolina poderia atuar como uma reserva temporária de N.

Em outra hipótese, como a via de síntese de prolina é redutora e consome NAD(P)H, é possível que isto fosse benéfico durante o fechamento de estômatos, compensando parcialmente a redução no ciclo de Calvin e representando um escoadouro de NAD(P)H e de elétrons da cadeia de transportes, e assim reduzindo a formação de EROs e o estresse oxidativo resultante. Nesse caso, o acúmulo de prolina serviria na realidade como uma reserva temporária de NAD(P)<sup>+</sup> para dissipar o excesso de elétrons que não estão mais sendo direcionados para o processo de redução de  $\text{CO}_2$ . Em concordância a esta hipótese, durante a reidratação, a prolina é oxidada, permitindo a recuperação do poder redutor consumido na etapa anterior (SHARMA; VILLAMOR; VERSLUES, 2011).

A aplicação exógena de prolina pode desempenhar um papel importante no aumento da tolerância ao estresse. Este papel pode ser na forma de osmoproteção (WYN JONES; GORHAM, 1983; HANDA et al., 1986). Por exemplo, em diversas espécies de plantas crescendo sob condições salinas, a aplicação de prolina exógena ofereceu osmoproteção e facilitou o crescimento (CSONKA; HANSON, 1991; YANCEY, 1994).

Inúmeras são as funções benéficas associadas a prolina, porém há uma questão se a prolina ou se o P5C (produto da degradação da prolina) é o causador de toxicidade na célula, ocasionando a morte celular, devido a elevadas concentrações (HELLMAN et al., 2000;

DEUSCHLE et al., 2001; MANI et al., 2002; AYLIFFE et al., 2002). Dados de Deuschle et al. (2004) sugerem que a toxicidade da Pro é mediada pela acumulação de GSA/P5C. P5C aplicado exogenamente aumentou a produção de EROs, reduzindo o crescimento e induzindo uma série de genes em resposta ao estresse. Comparado com a prolina, danos visíveis são encontrados em concentrações muito baixas de P5C e dentro dos tempos de incubação relativamente curto (1 mM após 3 d), o que sugere fortemente que P5C é o responsável pela toxicidade induzida por prolina (HELLMANN et al., 2000). Além disso, a superexpressão da desidrogenase do pirrolina-5-carboxílico (P5CDH) diminuiu a sensibilidade à aplicação externa de prolina, enquanto o nocaute de mutantes de *p5cdh* foi hipersensível a prolina (DEUSCHLE et al., 2004).

Em resposta a estresses abióticos, a prolina é acumulada gradualmente pelo aumento da síntese e supressão da sua degradação. Após a liberação do estresse, o complexo PDH-FAD oxida a prolina a P5C transferindo elétrons para a cadeia transportadora de elétrons (CTE) mitocondrial. Quando prolina é acumulada ou fornecida em excesso e a atividade de PDH é induzida e a de P5CDH não, a oxidação torna-se desacoplada. Sob tais condições, muito P5C é gerado na mitocôndria. Este é transportado para o citosol e reduzido pela P5CR a prolina, que é novamente transportada para as mitocôndrias. Este ciclo intensivo P5C-prolina eleva o fluxo de elétrons através PDH-FAD para a CTE mitocondrial e O<sub>2</sub>, levando a geração concomitante de EROs (MILLER et al., 2009). Sendo assim, o catabolismo da prolina é, portanto, um importante regulador de equilíbrio EROs celular e pode influenciar as numerosas vias reguladoras adicionais.

A complexidade da prolina reside no fato de esta adquirir funções que não são mutuamente exclusivas e, provavelmente, a razão pela qual as plantas acumulam prolina é que esta molécula pode desempenhar vários destes papéis ao mesmo tempo. Outro ponto-chave é que a função da prolina, provavelmente varia em diferentes estresses, como sugerido pelo acúmulo diferencial de prolina sob baixo potencial hídrico e estresse salino, por exemplo e a regulação diferencial de algumas enzimas do metabolismo de prolina pela salinidade e baixo potencial hídrico. Algumas destas funções, tais como o ajuste osmótico e sua atuação como um soluto compatível, dependerá das propriedades da própria prolina e a quantidade acumulada durante o estresse. Outras funções, tais como tamponamento redox, dependem do metabolismo de prolina e do fluxo de síntese ou catabolismo de prolina (VERSLUES; SHARMA, 2010).

#### 2.4. Regulação do acúmulo de prolina por hormônios vegetais

Sabe-se que o acúmulo de prolina é desencadeado por condições e causas distintas. Portanto, a planta provavelmente regula os níveis de prolina de acordo com a função que esta deva exercer dentro de uma condição específica. O acúmulo de prolina deve ser, portanto, resultante do processamento integrado de diversos sinais internos e externos, sendo que diferentes mecanismos de regulação e acúmulo podem ser acionados.

O processamento destes sinais é mediado por hormônios, sendo o ácido abscísico (ABA) considerado o mais importante na resposta ao estresse hídrico. Embora o ABA tenha múltiplas funções no desenvolvimento das plantas, a sua principal função é regular o equilíbrio hídrico dos tecidos vegetais aumentando a resistência ao estresse osmótico (ZHU, 2002; SCHROEDER; KWAK; ALLEN, 2001).

O hormônio vegetal ABA é sintetizado *de novo* sob condições de déficit hídrico e desempenha um papel importante na resposta e resistência à desidratação (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1999). Muito se sabe sobre o papel da ABA no fechamento estomático, bem como a produção de ABA em raízes desidratadas e sua circulação na planta (WILKINSON; DAVIES, 2002). No entanto, pouco é entendido sobre a relação exata entre déficit hídrico e a sinalização de ABA a longa distância e a natureza das interações entre ABA e outros os hormônios, tais como etileno, citocininas e ácido jasmônico (SAUTER; HARTUNG, 2000).

Alguns trabalhos demonstram a dependência de ABA no acúmulo de prolina em diferentes espécies (NAMBARA et al., 1998; VERSLUES; BRAY, 2006). No entanto, há evidências claras de que também existem vias independentes de ABA (SHARMA; VERSLUES, 2010), embora os componentes envolvidos nestes mecanismos de acúmulo de prolina sejam pouco conhecidos. Em tomateiro e cevada, alguns trabalhos demonstram a independência de ABA no acúmulo de prolina (STEWART; VOETBERG, 1987). No entanto, parece que a acumulação de prolina em plantas é mediada por ambas as vias de sinalização ABA-dependente e ABA-independentes (CHIANG; DANDEKAR, 1995; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997; HARE et al., 1999; ZHU, 2002).

A dependência por ABA para o acúmulo de prolina tem sido pouco abordada no contexto da regulação gênica do estresse, mesmo com a disponibilidade de mutantes ABA-deficientes e ABA-insensíveis. Porém, uma limitação destes estudos é que nenhum dos mutantes é completamente deficiente ou insensível à ABA, muitas vezes tornando a interpretação da independência por ABA equívoca.

Além do ABA, outros hormônios tais como o ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA), etileno (ET) e brassinosteróides (BR) estão envolvidos e interagem entre si na sinalização celular contra estresses e no acúmulo de prolina, conferindo proteção às plantas (BOSTOCK, 2005; MAUCH-MANI; MAUCH, 2005). Assim, outros hormônios podem atuar no acúmulo de prolina, por mecanismos dependentes ou independentes de ABA.

Em *Mesembryanthemum crystallinum*, uma halófita facultativa, foi demonstrado que citocininas mediarão o acúmulo de prolina e uma isoforma de PEPCase envolvida na transição de fotossíntese C3 para CAM, independente do estresse osmótico (THOMAS; MCELWAIN; BOHNERT, 1992). Curiosamente, descobertas relacionadas ao acúmulo de prolina induzida por citocininas contrastam com estudos anteriores, onde foi mostrado que a aplicação exógena de concentrações mais elevadas de citocinina impedia o acúmulo de prolina induzida pelo estresse (STEWART; VOETBERG; RAYAPATI, 1986; WAMPLE; BEWLEY, 1975).

Assim como a citocinina, é conhecido que o SA e o JA promovem o acúmulo de prolina em diversas espécies, porém pouco é conhecido sobre a regulação exercida por estas nas enzimas do metabolismo deste aminoácido. Estudos demonstram que o SA induz respostas mediadas por ABA em plantas sob déficit hídrico, principalmente o aumento do acúmulo de prolina (YOSHIBA et al., 1995; SHAKIROVA et al., 2003). A ação protetora do SA durante o déficit hídrico foi demonstrada pela produção elevada de prolina em plantas de tomate e amaranto (UMEBESE; OLATIMILEHIN; OGUNSUS, 2009) e pela ativação da *P5CS2* (FABRO et al., 2004).

Outra classe hormonal que tem sido mostrada participar da resistência a estresses abióticos são os brassinosteróides (BRs). Sabe-se que BRs também induzem o acúmulo de prolina, através de aplicação exógena em tomate e em outras espécies (BEHNAMNIA; KALANTARI; ZIAIE, 2009; FAROOQ et al., 2009). O efeito inibitório do escuro em *P5CS1* foi imitado por brassinolideo, uma das formas ativas de BR. No entanto, brassinolideo não estimulou *PDH*, e inibiu *P5CS2* somente na parte aérea. Assim, o acúmulo de prolina e a indução da transcrição de *P5CS1* são simultaneamente reforçadas em mutantes ABA-hipersensíveis e deficientes em brassinosteróides (*det2*), enquanto que a *P5CS2* mostra indução por ABA e por salinidade apenas no mutante *det2* (ABRAHAM et al., 2003).

A sistemina, um peptídeo sinalizador, cujo precursor é a prosistemina (PS), tem o papel de ativar a fosfolipase 2A, que irá atuar na liberação de ácido linoléico da membrana plasmática para biossíntese de ácido jasmônico e é encontrado somente nas Solanáceas (SUN; JIANG; LI, 2009). Estudos com transgênicos superexpressando prosistemina, mostraram



reduzidos conteúdos de prolina sob salinidade e a expressão do gene de P5CS foi reprimida, no entanto estes apresentaram maior resistência ao estresse (ORSINI et al., 2010).

Quando transgênicos com elevados níveis de prosisteminina foram submetidos à salinidade, estes apresentaram uma maior taxa de sobrevivência e um maior acúmulo de proteínas relacionadas a ferimentos. Essa maior taxa de sobrevivência foi relacionada à ativação de genes de resistência ao déficit hídrico induzidos pelo acúmulo das proteínas relacionadas a ferimentos (DOMBROWSKI, 2003). Porém, não se sabe ao certo se essa resistência é adquirida pelos elevados níveis de ácido jasmônico endógeno ou se é devido à presença elevada de sisteminina.

Alguns trabalhos têm demonstrado correlações entre o acúmulo de prolina em função da presença de ácido jasmônico (CHEN; KAO, 1993; SU et al., 2011; PERASSOLO et al., 2011). Chen e Kao (1993) verificaram aumentos no conteúdo de prolina com a aplicação de MeJa exógeno, porém os níveis de ABA não foram alterados, sugerindo que o aumento no nível de prolina é um efeito direto do MeJa e não de uma provável indução do ABA. Apesar dessa possível independência de ABA para realização do seu papel, recentes trabalhos demonstraram que o MeJa, assim como o ABA participa de mecanismos de resistência ao estresse hídrico através da indução do fechamento estomático (MUNEMASA et al., 2007; SUHITA et al., 2004) e que esta resposta do MeJa é dependente de ABA endógeno (HOSSAIN et al., 2011).

Entretanto, poucos trabalhos têm relacionado a ação das principais classes hormonais com o acúmulo de prolina, sendo mais escassos ainda os que demonstram algum controle das vias metabólicas através da regulação enzimática. Além disto, no caso do estresse hídrico e acúmulo de prolina, ainda não se sabe o nível de controle exercido por todas as classes hormonais. Portanto, estudos são necessários para se testar e avaliar os efeitos isolados e combinados destes hormônios no controle das vias de síntese e degradação de prolina em mutantes. Tais estudos devem visar também uma compreensão mais precisa e detalhada do metabolismo de prolina em plantas submetidas ao estresse hídrico. O conhecimento a ser gerado é relevante para a seleção de genótipos mais resistentes aos diversos tipos de estresses e para utilização como ferramenta em engenharia genética.

### **3. HIPÓTESE E OBJETIVO**

#### **3.1. Hipótese**

O acúmulo de prolina induzida pelo déficit hídrico depende da integração de sinais mediada por diferentes hormônios, através de mecanismos que podem ser dependentes ou independentes de ABA. Estes hormônios exercem um controle diferencial sobre a expressão dos genes e nas atividades das diferentes enzimas envolvidas na síntese e degradação da prolina.

#### **3.2. Objetivo geral**

Utilizar mutantes e linhagens transgênicas hormonais introgridas na cv. Micro-Tom (MT) de tomateiro para identificar os hormônios envolvidos no acúmulo de prolina e analisar o controle exercido sobre os genes e enzimas envolvidas no acúmulo deste aminoácido.

#### **3.3. Objetivos específicos**

- a) Caracterizar os efeitos fisiológicos do estresse hídrico nas folhas de MT e em mutantes selecionados: acúmulo de prolina, condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração (E), conteúdo relativo de água (CRA), potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) e integridade de membranas (vazamento de eletrólitos);
- b) Identificar mutantes e linhagens transgênicas hormonais de MT com acúmulo diferencial de prolina em condições de estresse hídrico;
- c) Avaliar quais enzimas exercem maior controle sobre o acúmulo diferencial de prolina entre materiais selecionados, através da mensuração das atividades das enzimas envolvidas nas vias de biossíntese e de degradação da prolina, ou seja, P5CS, P5CR, OAT e da P5CDH, em folhas de plantas submetidas a estresse;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material vegetal e condução das plantas

Sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) da variedade Micro-Tom (MT) e seus respectivos mutantes e linhagens transgênicas foram desinfetadas superficialmente com uma solução a 5 % (v/v) de água sanitária comercial (contendo 2% de hipoclorito de sódio) por 15 min, sob agitação e lavadas com água destilada por três vezes. Em seguida, as sementes foram imersas em água destilada durante 60 h, sob agitação, em incubadora a 28 °C, para embebição e maior uniformidade e rapidez do processo de germinação. Após a germinação, as plântulas foram transferidas para diferentes substratos de acordo com o experimento realizado. Todas as plantas foram crescidas sob condições ambientais controladas, em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 h, temperatura média de  $28 \pm 2$  °C e  $23 \pm 2$  °C durante o dia e a noite, respectivamente, e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (FFFA) de aproximadamente  $350 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 2A).

### 4.2. Abordagem experimental e experimentos

#### 4.2.1. Experimento 1 - Caracterização da resposta da cultivar Micro-Tom ao déficit hídrico por suspensão de rega

Para a caracterização do comportamento da cultivar MT de tomateiro quando submetido ao déficit hídrico em relação ao acúmulo de prolina e de outros parâmetros fisiológicos, foi realizado um experimento com suspensão de rega. A análise de outros parâmetros, além do acúmulo de prolina, teve o objetivo adicional de verificar se algum destes pudesse ser usado para a determinação do momento de coleta em experimentos futuros. Seis plântulas de MT recém-germinadas foram transferidas para vasos de 700 mL contendo 75% de substrato comercial (tipo PlantMax) e 25% de areia acrescidos de 1 g de adubo NPK (10-10-10) por litro do substrato misturado.

Os vasos foram irrigados diariamente com água destilada até 18 dias após o transplântio. A partir de então, um lote controle foi irrigado diariamente com água destilada até a capacidade de campo enquanto no lote do tratamento a rega foi suspensa totalmente, promovendo o déficit hídrico. Considerou-se a possibilidade de se suspender a rega e depois manter o  $\Psi_w$  do substrato em um nível constante e conhecido, por meio de pesagens dos

vasos e adições definidas de água. Para tanto, foi obtida uma curva de retenção de água da mistura de substrato empregada (Apêndice A). No entanto, como pode ser observado pela curva de retenção, com a secagem mais adiantada do substrato, o  $\Psi_w$  deste varia muito com perdas muito pequenas de água, de modo que a pesagem do vaso não permitia uma resolução adequada para determinação do  $\Psi_w$  do substrato com precisão, o que foi inclusive constatado em um experimento prévio. Mesmo assim, registrou-se o peso dos vasos com a secagem.

Foram realizadas mensurações diárias de condutância estomática ( $g_s$ ) e transpiração (E). Após o quinto dia de déficit hídrico, as plantas apresentavam pouca turgidez foliar e início do enrolamento das bordas dos folíolos, e as mesmas foram coletadas para determinação do potencial hídrico foliar, conteúdo relativo de água (CRA), vazamento de eletrólitos e conteúdo foliar de prolina.

#### **4.2.2. Experimento 2 - Seleção de mutantes e linhagens transgênicas hormonais com acúmulo diferencial de prolina sob déficit hídrico por suspensão de rega**

Uma primeira triagem foi realizada com o objetivo de encontrar mutantes ou linhagens transgênicas hormonais que, sob déficit hídrico, pudessem apresentar um acúmulo de prolina diferenciado do genótipo controle MT. Para isto, foram escolhidos 12 genótipos, entre mutantes e linhagens transgênicas, sendo incluído pelo menos um genótipo para cada classe hormonal (Tabela 1). Todos os mutantes e linhagens transgênicas haviam sido introgrididos anteriormente em MT.

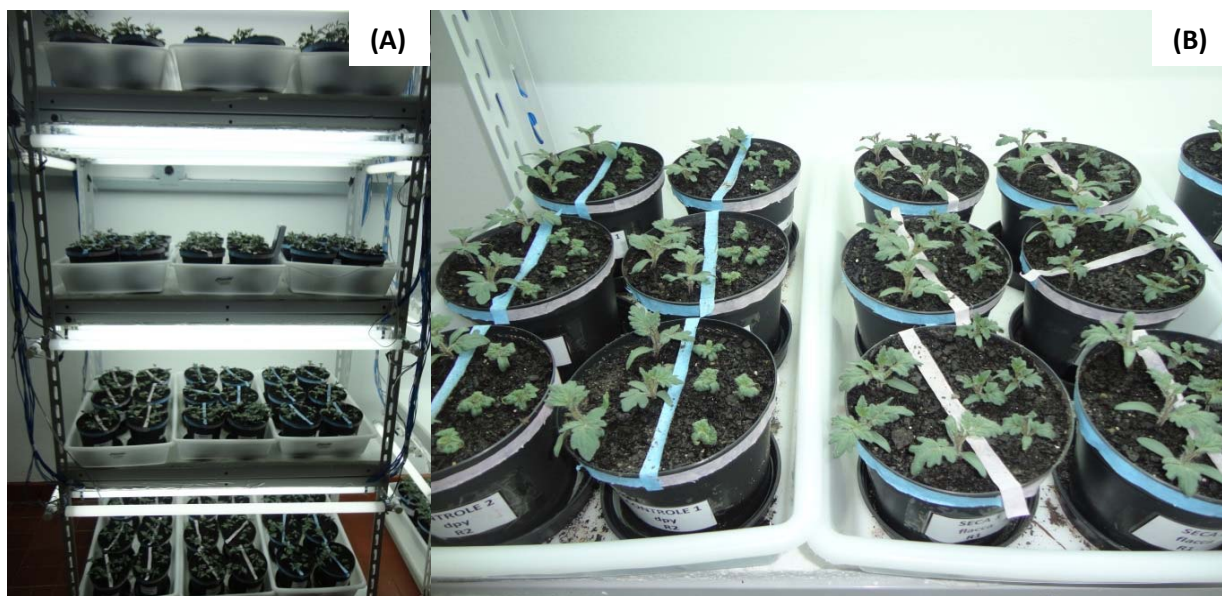
Após a germinação das sementes, as plântulas foram transferidas para vasos de 700 mL contendo substrato e adubo e irrigados conforme descrito para o Experimento 1. Os materiais transgênicos, exceto o *35S::CKX2*, foram transplantados uma semana antes dos demais materiais, pois na ocasião se achava que alguns deles possuíam desenvolvimento um pouco mais atrasado e, portanto, um ciclo maior.

**Tabela 1** - Mutações hormonais introgrididas em Micro-Tom (MT) e linhagens transgênicas hormonais de MT utilizados neste trabalho

Genótipo	Característica
<i>diageotropica (dgt)</i>	Mutação no gene de biossíntese de ciclofilina. Mutante com reduzida sensibilidade ao hormônio auxina (OH et al., 2006).
<i>Never ripe (Nr)</i>	Mutação no receptor de etileno (LeETR3). Mutantes com reduzida sensibilidade ao etileno (WILKINSON et al., 1995)
<i>procera (pro)</i>	Mutação pontual, no domínio de repressão VHV(I/V)D, necessário para ação das proteínas DELLA. Mutantes mostram uma resposta constitutiva a giberelina (BASSEL; MULLEN; BEWLEY, 2008).
<i>dumpy (dpy)</i>	Mutação defectiva na conversão de 6-deoxocatasterona a 6-deoxoteasterona. Mutantes deficientes em brassinosteróides (KOKA et al., 2000).
<i>notabilis (not)</i>	Mutação na enzima dioxigenase do 9-cis-epoxicarotenoide (NCED). Mutantes com reduzidos níveis de ABA (BURBIDGE et al., 1999).
<i>sitiens (sit)</i>	Mutação na enzima ABA-aldeído oxidase. Mutantes deficientes em ABA (TAYLOR et al., 1988).
<i>flacca</i>	Mutação na enzima sulfurase que atua na maturação do cofator de Mo, necessário para a atividade de ABA-aldeído oxidase. Mutantes com reduzidos níveis de ABA (MARIN; MARION-POLL, 1997).
<i>DR5::GUS</i>	Transgênico com promotor responsivo a auxina fusionado ao gene repórter GUS (ULMASOV et al., 1997).
<i>35S::CKX2</i>	Superexpressão de citocinina oxidase. Transgênico com reduzidos níveis endógenos de citocinina (WERNER et al., 2003).
<i>35S::nahG</i>	Superexpressão da enzima hidroxilase do ácido salicílico. Transgênico com reduzidos níveis de SA (BRADING et al., 2000).
<i>35S::Prosistemina (35S::PS)</i>	Superexpressão do transgene prosistemina, regulador positivo da via de sinalização de JA (McGURL et al., 1994)
<i>35S::asCCD7</i>	Superexpressão do “antisense” para dioxigenases de carotenóides do tipo CCD7/MAX3. Transgênico com reduzidos níveis de estrigolactonas (KOLTAI et al., 2010).

Por não se encontrarem em homozigose, foi necessário selecionar os transgênicos *35S::nahG*, *35S::PS* e *35S::asCCD7* com canamicina (400 mg/L) através de pulverização foliar diária durante quatro dias, após a expansão do primeiro par de folhas verdadeiras. Isto tornou necessário o emprego de um material controle MT que também contivesse o gene de resistência à canamicina, *nptII*, e que também fosse tratado com canamicina do mesmo modo que os outros materiais transgênicos. Assim, foi utilizada a linhagem transgênica *DR5::GUS* que, além de *nptII*, possui um promotor responsivo à auxina ligado a um gene repórter GUS. A presença deste promotor e do gene repórter GUS não devem afetar o desempenho deste genótipo quanto a qualquer parâmetro fisiológico, sendo, portanto, neutros. Daqui por diante, neste trabalho esta linhagem transgênica será denominada de MT<sub>RC</sub> (MT resistente à canamicina).

A suspensão de rega foi iniciada com 19 dias após o transplântio (DAT). Para que o MT (controle) e cada mutante ou linhagem transgênica testada experimentassem um mesmo  $\Psi_w$  do substrato, cada par de genótipos foi colocado no mesmo vaso; um genótipo em cada metade do vaso (Figura 2B).



**Figura 2** - Sistema experimental utilizado nos experimentos. (A) Sala de crescimento com condições ambientais controladas: fotoperíodo de 16/8 h, temperatura média de  $28 \pm 2$  °C e  $23 \pm 2$  °C, durante o dia e a noite, respectivamente, e intensidade luminosa de aproximadamente  $350 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (B) Sistema de exposição ao déficit hídrico por seca, onde se encontram no mesmo vaso o genótipo controle Micro-Tom e um mutante ou transgênico avaliado

Foram realizadas duas coletas, em dias seguidos e, conseqüentemente, a diferentes valores de  $\Psi_w$  do substrato. A duração da suspensão de rega variou entre os genótipos devido tanto à resistência diferencial destes como a diferenças de evapotranspiração. Todos os

genótipos transgênicos e os mutantes *dpy*, *Nr* e *dgt* foram submetidos a oito dias de déficit hídrico. Os mutantes *not* e *pro* foram submetidos a sete dias, *sit* a seis dias e *flacca* a cinco dias de déficit hídrico.

#### **4.2.3. Experimento 3 - Caracterização do acúmulo de prolina em mutantes e linhagens transgênicas hormonais sob estresse osmótico induzido por PEG a diferentes valores de $\Psi_w$**

Por conferir potenciais hídricos idênticos e ao mesmo tempo para todas as plantas, o PEG-6000 foi empregado para induzir estresse osmótico neste e nos experimentos posteriores.

Baseado no experimento anterior (Experimento 2), de suspensão de rega, foram selecionados alguns genótipos que apresentaram um acúmulo diferencial de prolina, para serem empregados nestes experimento. Estes genótipos foram o mutante *sitiens* e as linhagens transgênicas *35S::CKX2*, *35S::nahG* e *35S::PS*. Como controles, foram empregados o MT e o MT<sub>RC</sub>.

Após a germinação das sementes, as plântulas foram transferidas para bandejas contendo vermiculita onde foram mantidas por duas semanas. Estas foram irrigadas diariamente com água destilada e a cada cinco dias foram feitas aplicações de solução nutritiva de Hoagland modificada meia força (ARNON; HOAGLAND, 1940), totalizando 3,5 L em três aplicações. Após duas semanas na vermiculita, as plantas foram transferidas para bandejas com sete litros de solução nutritiva de Hoagland a meia força. A solução nutritiva foi trocada três dias após a transferência e depois mantida sem troca até a aplicação do PEG-6000, uma semana depois da transferência. A seleção dos transgênicos que não se encontravam em homozigose foi feita através de pulverização foliar diária com canamicina (400 mg/L), durante quatro dias, quando estes já se encontravam na solução nutritiva.

O primeiro potencial hídrico escolhido teve como objetivo um maior acúmulo de prolina. Portanto, as plantas deste primeiro experimento foram submetidas a um  $\Psi_w$  de -1,2 MPa (326g PEG/L) (MICHEL; KAUFMANN, 1973), caracterizando-se como um estresse severo. Para analisar o acúmulo de prolina em potenciais mais elevados, um segundo potencial de -0,8 MPa (262 g PEG/L), foi escolhido caracterizando um estresse moderado. A solução nutritiva das plantas controle (sem estresse osmótico) foi trocada. Já nos tratamentos de estresse osmótico, o PEG foi diluído na própria solução, reduzindo-se o volume nas bandejas para cinco litros. Como o acúmulo de prolina é rápido em soluções nutritivas com PEG, foram realizadas amostragens a cada 12 horas durante 36 horas. Foram feitas medidas

de potencial hídrico foliar, CRA e coleta de folhas em nitrogênio líquido para análise de prolina.

#### **4.2.4. Experimento 4 - Papel do ácido jasmônico na resposta de 35S::PS ao estresse osmótico e acúmulo de prolina**

Este experimento teve como objetivo verificar se a resposta da linhagem transgênica 35S::PS, que apresenta elevado nível de prosistemina (PS), ao estresse osmótico, seria predominantemente devido a um maior nível de JA. Ou seja, se a resposta de PS poderia ser mimetizada pela aplicação exógena de JA no genótipo controle MT.

Foram utilizados os genótipos MT<sub>RC</sub> e o 35S::PS. As plantas foram germinadas e conduzidas conforme descrito para o Experimento 3. Um grupo de plantas MT<sub>RC</sub> foi pulverizada com uma solução de MeJa 100 µM com o objetivo de simular uma planta com altos níveis de ácido jasmônico, como é o caso da 35S::PS. Nas plantas de MT<sub>RC</sub> controle e 35S::PS foi aplicado somente água a pH 6,0, ajustado com KOH. Foram realizadas três pulverizações; a primeira logo após a troca para solução nutritiva, a segunda três dias após a primeira e a última imediatamente anterior à aplicação de PEG-6000 ( $\Psi_w = -1,2$  MPa). A coleta foi realizada após 12 h de tratamento em PEG-6000. Foram feitas determinações de potencial hídrico foliar, CRA e folhas foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas em -80°C, para análise de prolina, enzimas e expressão de genes.

#### **4.2.5. Experimento 5 - Papel do JA e sua dependência de ABA no acúmulo de prolina e na regulação enzimática do metabolismo de prolina em mutantes defectivos em ABA sob estresse osmótico**

Para avaliar o papel do ácido jasmônico e sua dependência por ABA no acúmulo de prolina foi realizado um experimento com MT e o mutante *sitiens*. Este mutante é deficiente em ABA, portanto uma ferramenta importante para o estudo de dependência por ABA. A condução das plantas até a solução nutritiva foi semelhante aos experimentos anteriores com PEG. Após a transferência para solução nutritiva, foram aplicados, em grupos de plantas diferentes, os seguintes tratamentos: aplicação de ABA 100 µM, aplicação de MeJa 100 µM e aplicação de ABA+MeJa 100 µM. Como o ABA foi dissolvido em uma gota de KOH 1M e a solução ajustada para um pH 6,0, as plantas controle, as quais não receberam nenhum



hormônio e as com MeJa somente, foram pulverizadas com uma solução de água e KOH pH 6,0. As plantas foram pulverizadas com estas soluções logo após a transferência para a solução nutritiva, três dias após a primeira aplicação e imediatamente antes da aplicação do PEG-6000. As plantas foram coletadas para análise após 12 h sob PEG a um potencial de -1,2 MPa. Foram feitas determinações de potencial hídrico foliar e CRA e folhas foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas em -80°C para análise de prolina, enzimas e expressão de genes.

#### **4.3. Condutância estomática (g<sub>s</sub>) e transpiração (E)**

A condutância estomática e a transpiração foram mensuradas utilizando um porômetro Li-Cor 1600 Steady-State. A perda de água é determinada pela mensuração da taxa de fluxo de ar seco necessário para manter a umidade relativa dentro da cubeta. A umidade relativa do ambiente é usada como ponto nulo e o ar seco é injetado na cubeta a uma taxa suficiente para balancear a taxa de transpiração da folha. A resistência estomática (ou condutância) é calculada diretamente a partir de valores de umidade relativa, temperatura do ar e da folha e taxa de fluxo. Já a transpiração foliar está relacionada à taxa de fluxo volumétrico através da densidade do vapor de água na cubeta, densidade de vapor de água do ar seco (assumida como sendo de 2%) que entra na cubeta e da área foliar. Todos os valores foram expressos em  $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

#### **4.4. Conteúdo relativo de água**

O conteúdo relativo de água (CRA) foi determinado de acordo com Fidalgo et al. (2004). Foram coletados vinte discos foliares (10 mm de diâmetro) e o peso fresco (PF) determinado imediatamente. Em seguida, os discos foram imersos em 30 ml de água deionizada em placas de Petri. Após 8 h de imersão em água, os discos foram retirados e secos ligeiramente em papel toalha, para remover o excesso de água, e então foi determinada o peso túrgido (PT). O peso seco (PS) foi determinada após secagem dos discos a 70°C, durante 72 h em estufa, e o CRA determinado pela seguinte relação:  $[(\text{PF} - \text{PS})/(\text{PT} - \text{PS})] \times 100$ .

#### 4.5. Potencial hídrico foliar

As medições do potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) foliar foram realizadas por ocasião da coleta das plantas em folhas completamente expandidas, utilizando-se uma câmara de pressão do tipo Scholander. A câmara de pressão mede a pressão hidrostática negativa que existe no xilema das plantas. Neste caso, é assumido que o  $\Psi_w$  do xilema é igual ao potencial  $\Psi_w$  médio de todo o órgão.

#### 4.6. Vazamento de eletrólitos (dano de membrana)

O dano de membrana foi avaliado com base no vazamento de eletrólitos conforme descrito por Shanahan et al., (1990), com pequenas modificações. Cerca de 20 discos foliares de 10 mm de diâmetro foram acondicionados em tubos hermeticamente fechados contendo 10 ml de água deionizada e incubados a temperatura ambiente durante 8 h e determinada a condutividade elétrica da solução (C1). Em seguida os tubos foram incubados a 100 °C por 1 hora e após atingir a temperatura ambiente foi determinada a condutividade elétrica da solução (C2). O índice de estabilidade de membrana foi estimado pela relação:  $IEM = [1 - (C1/C2)] \times 100$ .

#### 4.7. Conteúdo de prolina

O conteúdo de prolina foi determinado segundo método descrito por Bates et al, (1973). Amostras de 150 mg foram extraídas em 2 mL de água a 100°C por 1 h. Aliquotas de 1 mL do extrato foram transferidas para tubos de ensaio contendo 1mL de ninidrina ácida (0,5g de reagente ninidrina em 12 ml de ácido acético glacial e 8 mL de ácido fosfórico 6 M) e 1 mL de ácido acético glacial concentrado. Após homogeneização em vórtex, os tubos hermeticamente fechados foram levados ao banho maria a 100 °C por 1 hora. Em seguida a reação foi interrompida por redução da temperatura com banho de gelo e adicionado 2 mL de tolueno ao meio de reação. Após a homogeneização, foram formadas duas fases, a fase aquosa superior de coloração avermelhada (cromóforo+tolueno), foi aspirada com pipeta de Pasteur de vidro e submetida à leitura em espectrofotômetro a 520 nm. Os teores de prolina foram determinados a partir de uma curva padrão de prolina.

#### **4.8. Extração e ensaios enzimáticos**

A extração enzimática foi realizada como descrita por Ferreira-Silva (2008) com modificações. Amostras de folhas jovens frescas (0,3 g) foram maceradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido seguido da adição de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), contendo 30 mM de DTT, 20% de glicerol, 3% de PEG-6000 e 1 % PVPP. Houve a retirada do PVPP do tampão para a determinação de glutamina sintetase. Após a extração, o extrato foi centrifugado a 14.000 g durante 30 min, a 4 °C. O sobrenadante foi então coletado para as determinações das atividades enzimáticas.

##### **4.8.1. Determinação de proteínas solúveis**

O conteúdo de proteínas solúveis no extrato enzimático foi determinado conforme Bradford (1976). Aliquotas de 100 µL de extrato enzimático foram diluídas 40 vezes com água deionizada, com posterior adição de 2,5 mL do reagente de Bradford. Os tubos então foram homogeneizados e permaneceram por 15 min a temperatura ambiente até serem lidas em espectrofotômetro a 595 nm. O conteúdo de proteínas solúveis foi determinada com base em curva padrão, utilizando BSA.

##### **4.8.2. Síntese de $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5C)**

A síntese do  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5C) foi realizada de acordo com Williams e Frank (1974). Um total de 4,4 mL de 50 mM de metaperiodato de sódio (pH 7,0) foi misturado rapidamente a 2,8 mL de 70 mM de hidroxilisina a 4°C. Exatamente 8 minutos após a mistura, o periodato remanescente foi destruído com 70 µL de glicerol 1M, e após 2 minutos a reação foi acidificada com 60 µL de HCl 6 N. A mistura total foi aplicada a uma coluna AG 50W de 18 cm x 1,4 cm, previamente equilibrada com água após a agitação com HCl 1 M por 20 min seguido por sucessivas lavagens com água destilada até a estabilização do pH em 5,1. A coluna foi eluída com HCl 1M a uma taxa de fluxo de 40 ml/h. O eluído foi coletado em 55 frações de 2 mL cada. O P5C foi detectado nas frações através da reação de 20 µL do eluído com 20 µL de acetato de sódio 3M e 500 µL de 0,15% de ninidrina em ácido acético glacial a 100 °C por 5 minutos, pelo aparecimento de uma cor vermelho-cereja. Essas frações com P5C foram misturadas e a concentração de P5C nesta solução foi determinada com 100 µL desta solução com 1 mL de 0,5% de o-AB em 100% etanol. Após 40 minutos a

temperatura ambiente, a reação foi lida a 444 nm contra o branco e a concentração de P5C calculada a partir do coeficiente de extinção molar do complexo de  $2940 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Para a realização das atividades enzimáticas de P5CR e P5CDH, a solução de HCl 1M contendo o P5C foi neutralizada com KOH 10M, até atingir um pH de 7,0, imediatamente antes da preparação do meio de reação das enzimas.

#### **4.8.3. Sintetase do $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5CS; EC 1.5.1.12)**

A determinação da atividade enzimática da sintetase do  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5CS) foi conduzida como descrita por Parre et al. (2010). A reação é baseada na mensuração da atividade específica da P5CS pela quantificação do fosfato inorgânico gerado, conforme descrito por Spokas e Spur, (2001).

Para mensurar a atividade enzimática da P5CS foram pipetados em tubos 0,5 mL do tampão de reação (Tris 100 mM pH 7,5,  $\text{MgSO}_4$  6 mM, EDTA 2 mM e KCl 100 mM) juntamente com 50  $\mu\text{L}$  de DTT 200 mM, 50  $\mu\text{L}$  de glutamato de sódio 1,2 M, 100  $\mu\text{L}$  de NADPH 5 mM, 100  $\mu\text{L}$  de ATP 25 mM e 200  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37 °C por 20 minutos em banho-maria. As reações foram paralisadas com a retirada e adição de 400  $\mu\text{L}$  da reação em tubos contendo 1,4 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,0 contendo 10 % SDS. Os tubos foram homogeneizados em um agitador de tubos para a completa paralização da reação. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 1 % e molibdato de amônio 0,1 % em um volume final de 2 mL. Os tubos foram agitados e permaneceram durante 30 minutos a temperatura ambiente até serem submetidos à leitura em espectrofotômetro a 870 nm. Foram feitos dois brancos, um primeiro para zerar o aparelho (com todos os reagentes mais o tampão de extração em substituição do extrato) e um segundo para quantificar o fósforo inorgânico presente na amostra (com adição de todos reagentes mais o extrato, porém a reação foi paralisada logo após a adição do extrato). O cálculo da atividade de P5CS foi feito pela subtração das leituras das amostras pelo segundo branco de cada amostra, sendo então o resultado aplicado na equação da reta obtida por uma curva padrão de  $\text{P}_i$ .

#### 4.8.4. Redutase do $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5CR; EC 1.5.1.2)

A atividade enzimática da redutase do  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5CR) foi conduzida como descrita por Lutts et al. (1999). A reação é baseada na redução do P5C pelo NAD(P)H. Para mensurar a atividade da enzima, foram pipetados 0,9 mL de tampão Tris-HCl (tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0, dithiothreitol 1 mM, NADPH 0,17 mM e  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato 0,68 mM em eppendorfs mantidos em a 30 ° C. As reações foram iniciadas com a adição de 0,1 mL de extrato. Após homogeneização, um decréscimo linear na absorvância a 340 nm durante 5 minutos foi observado e a atividade enzimática foi mensurada depois de 2 minutos. O branco consistiu da mistura de reação na ausência do extrato enzimático. A atividade de P5CR foi calculado a partir do coeficiente de extinção molar NAD(P)H e expresso como nmol NADPH mg<sup>-1</sup> proteína min<sup>-1</sup>.

#### 4.8.5. Ornitina aminotransferase (OAT; EC 2.6.1.13)

A atividade enzimática da ornitina aminotransferase (OAT) foi mensurada pelo método de Kim et al.(1994). O método é baseado em uma reação específica do  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5C) com ninidrina sob condições quentes e muito ácidas. A reação foi executada em um meio contendo Tris-HCl 100 mM pH 8,0, L-ornitina 35 mM,  $\alpha$ -cetoglutarato 5 mM e piridoxal fosfato 0,05 mM. A reação foi iniciada com a adição de 0,3 mL de extrato enzimático. A incubação foi feita a 37 °C por 30 min. A reação foi paralisada pela adição de 0,3 mL de ácido perclórico 3N e 0,2 mL de 2 % de ninidrina. Os tubos foram incubados por 5 min a 100 °C em banho-maria e depois repassados para tubos eppendorfs e centrifugados por 10 min a 10.000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido em 1,5 mL de etanol e centrifugado novamente a 10 000 g por 5 minutos para a precipitação de proteínas. A absorvância foi mensurada a 510 nm e a concentração de P5C formado foi calculado a partir do coeficiente de extinção molar do P5C 16500 M. cm<sup>-1</sup>. A atividade de OAT foi expressa em nmol P5C formado. mg<sup>-1</sup> proteína min<sup>-1</sup>.

#### 4.8.6. Desidrogenase do $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5CDH; EC 1.5.1.12)

A atividade enzimática da desidrogenase do  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5CDH) foi conduzida como descrita por Chen et al. (2001). A reação é baseada na oxidação do P5C pelo NAD(P)<sup>+</sup>. Para mensurar a atividade da enzima, foram pipetados 0,9 mL de tampão Tris-HCl (tampão Fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, NAD<sup>+</sup> 4 mM e ácido D1-pirrolina-5-carboxílico 0,68 mM em eppendorfs mantidos a 30 ° C. As reações foram iniciadas com a adição de 0,1 mL de extrato. Após homogeneização, um decréscimo linear na absorbância a 340 nm durante 2,5 minutos foi observado e a atividade enzimática foi mensurada depois de 1,5 minutos. O branco consistiu da mistura de reação na ausência do extrato enzimático. A atividade de P5CDH foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar do NADH e expresso como nmol NADH formado mg<sup>-1</sup> proteína min<sup>-1</sup>.

#### 4.9. Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições, com exceção do experimento de seleção de mutantes e transgênico em PEG com  $\Psi_w$  de -1,2 MPa foi delineado em blocos ao acaso. Após análise de variância, as médias foram comparadas por teste Duncan a 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT versão 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2002).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização da cultivar Micro-Tom sob déficit hídrico

Plantas de MT com 18 dias após o transplântio (DAT) foram submetidas à suspensão de rega por oito dias visando caracterizar a resposta desta cultivar ao déficit hídrico, nas condições experimentais empregadas, e determinar o tempo de estresse que resultaria em maior acúmulo de prolina.

No quinto dia de suspensão de rega, a condutância estomática ( $g_s$ ) e a transpiração (E) já mostraram uma queda acentuada, de 9,6 e 8 vezes, respectivamente (Figuras 3A e 3B), diminuindo apenas um pouco mais até o oitavo dia.

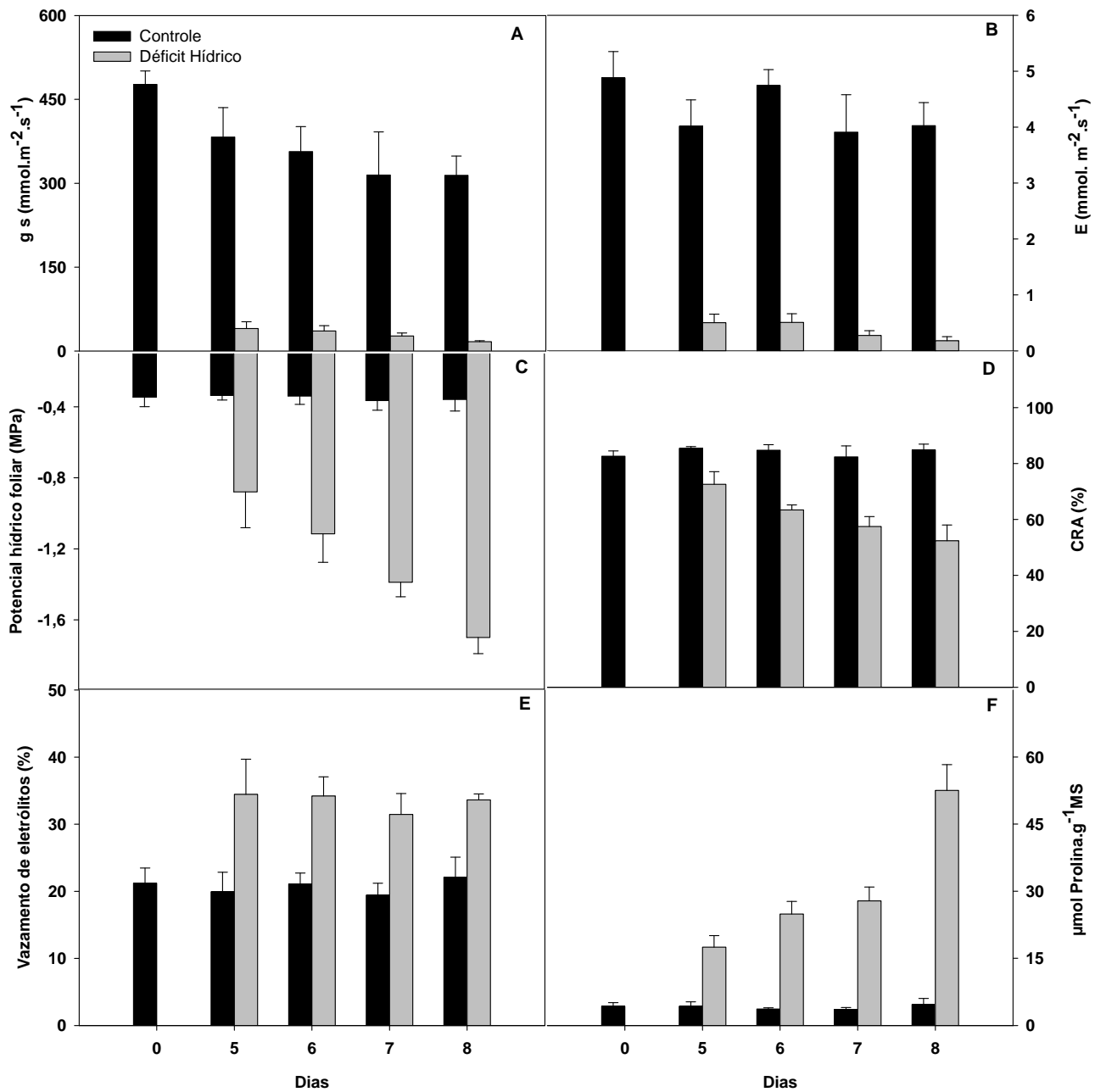
O potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) foliar diminuiu linearmente entre o 5º e 8º dia da suspensão de rega, chegando a um potencial de -1,7 MPa no 8º dia, enquanto que as plantas controle irrigadas mostraram um potencial hídrico foliar constante de -0,34 MPa (Figura 3C).

Foi observada uma redução progressiva no conteúdo relativo de água (CRA) entre o 5º e 8º dia de suspensão de rega, mas não tão acentuado quanto à queda no  $\Psi_w$  foliar, atingindo um valor de 52% no 8º dia de seca. Valores médios de CRA de 83% foram encontrados nas plantas irrigadas (Figura 3D).

No 5º dia de suspensão de rega, o vazamento de eletrólitos já se encontrava elevado, com valor de 34% e permaneceu constante com o avanço do estresse. Nas plantas irrigadas foram encontrados valores médios de vazamento de eletrólitos de cerca de 20% (Figura 3E).

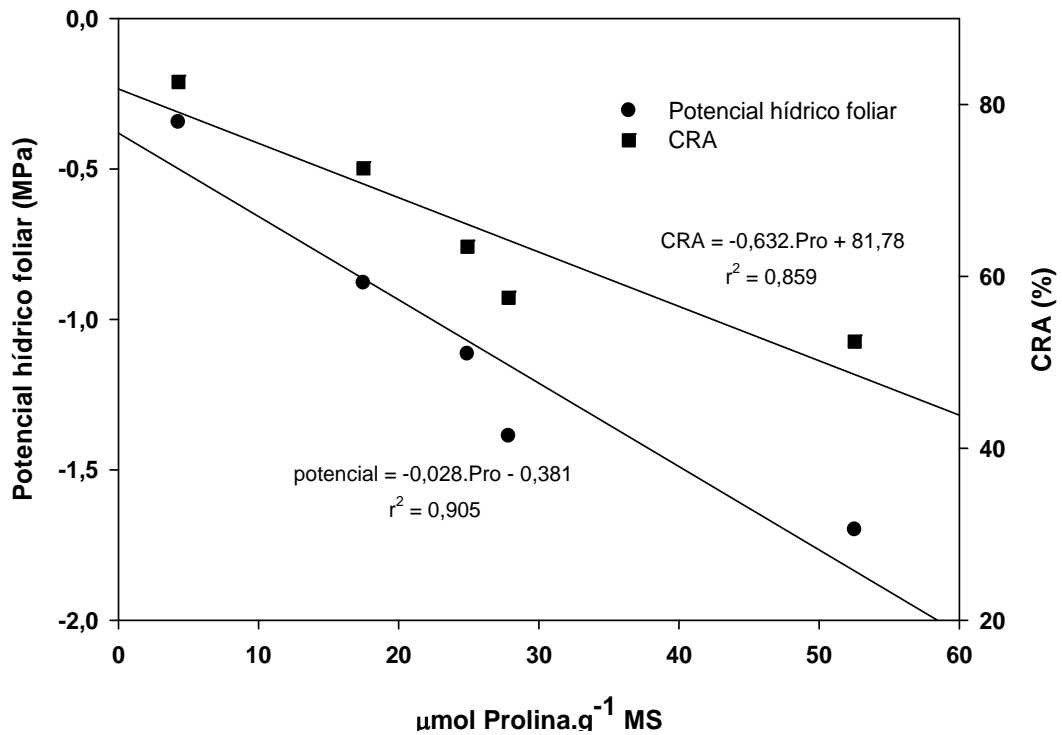
O conteúdo de prolina aumentou acentuadamente com a suspensão de rega, principalmente do 7º ao 8º dia, em que houve um incremento de 27,8 para 52,5  $\mu\text{mol}$  de prolina  $\text{g}^{-1}$  MS. No oitavo dia de déficit hídrico, o conteúdo de prolina foi 11,2 vezes maior do que os valores encontrados em plantas irrigadas (Figura 3F).

Tomando-se os dados em conjunto, verificou-se que  $g_s$ , E e o vazamento de eletrólitos sofreram alterações antes do acúmulo de prolina, sendo indicadores pobres do acúmulo deste. Entre os parâmetros avaliados, somente o potencial hídrico foliar e o CRA mostraram boa correlação ( $r^2 = 0,91$  e  $0,86$ , respectivamente) com o acúmulo de prolina em folhas de MT (Figura 4).



**Figura 3** – Resposta da cultivar Micro-Tom ao déficit hídrico. Plantas com 18 DAT foram submetidas ao déficit hídrico pela suspensão de rega por 8 dias. Condutância estomática (A), transpiração (B), potencial hídrico foliar (C), conteúdo relativo de água (D), vazamento de eletrólitos (E) e conteúdo de prolina (F) foram avaliados em folhas com o objetivo de determinar o ponto de coleta em experimentos com genótipos de Micro-Tom. Barras representam o desvio padrão (n=3)





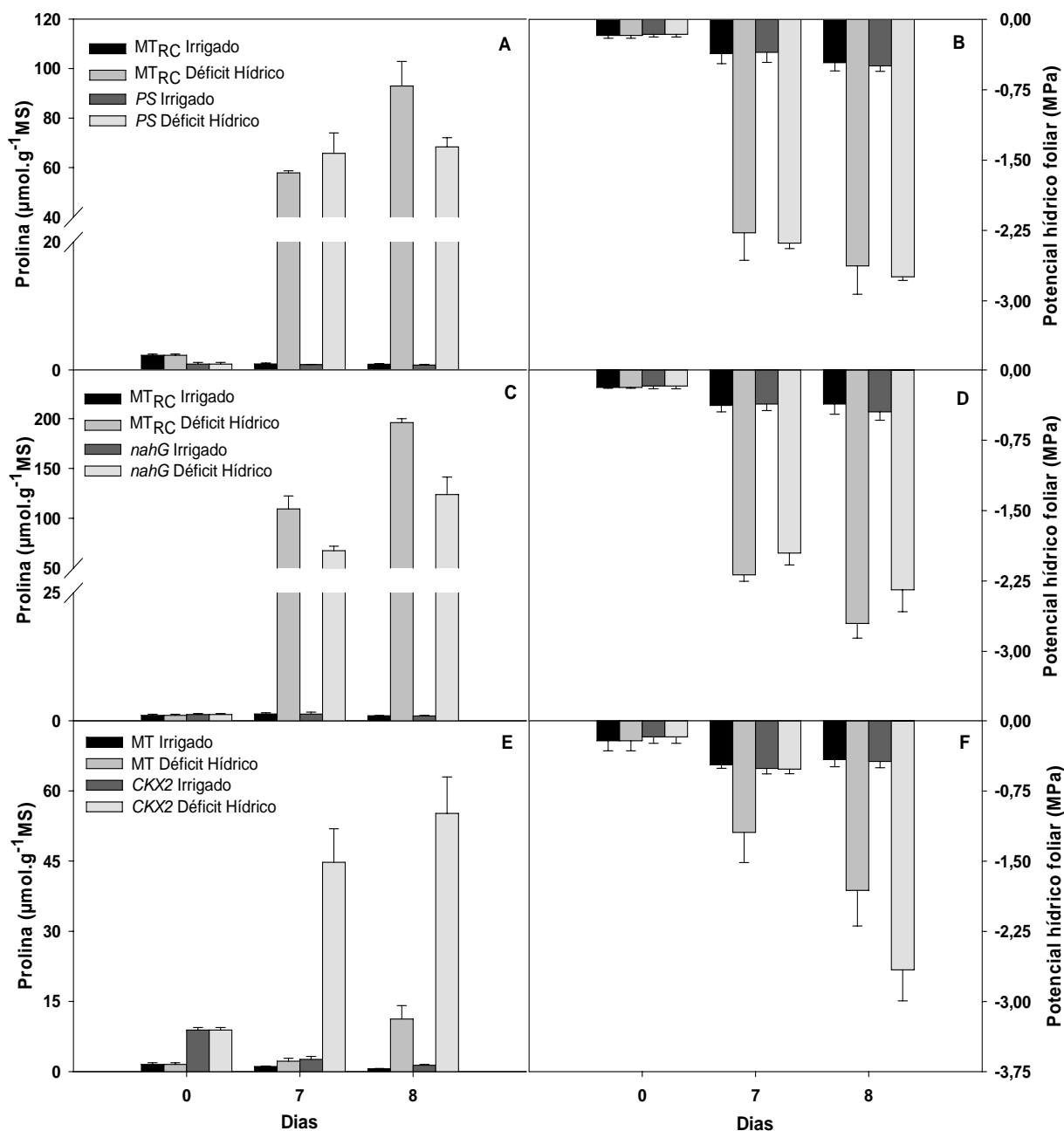
**Figura 4** - Correlação dos dados obtidos de potencial hídrico foliar ou conteúdo relativo de água (CRA) com conteúdo de prolina em tomateiro Micro-Tom sob déficit hídrico por 8 dias

## 5.2. Acúmulo de prolina em mutantes e linhagens transgênicas hormonais de Micro-Tom sob déficit hídrico

No experimento realizado para a seleção de mutantes e linhagens transgênicas sob déficit hídrico foram utilizados 11 genótipos, sendo pelo menos um de cada classe hormonal. Dois controles foram utilizados, o MT para os mutantes e o MT<sub>RC</sub> para os transgênicos que não estivessem em homozigose. Baseado no experimento anterior, fez-se coletas de acordo com o aspecto visual dos genótipos submetidos ao déficit hídrico por 4 a 7 dias. São apresentados apenas os genótipos em que foram observados acúmulos diferenciais de prolina. Os resultados dos demais genótipos são encontrados no Apêndice B.

Os genótipos *35S::PS* (superexpressor de prosisteminina) e *35S::nahG* (reduzido nível de SA) tiveram seu conteúdo de prolina inferiores em 26,4% e 36,8 %, respectivamente, no oitavo dia de seca quando comparado ao MT (Figuras 5A e 5C). Embora os conteúdos de prolina tenham sido relativamente baixos nestes dois genótipos, somente o *35S::nahG* teve um potencial hídrico foliar mais elevado que o MT<sub>RC</sub>, enquanto que no *35S::PS* não houve diferença no potencial hídrico foliar em relação ao MT<sub>RC</sub> (Figuras 5B e 5D).

Já o genótipo *35S::CKX2* (reduzido nível de citocinina) apresentou um conteúdo de prolina superior em cerca de 20 e 4,9 vezes em relação ao do  $MT_{RC}$ , no sétimo e oitavo dia de suspensão de rega, respectivamente (Figura 5E). Seu potencial hídrico apresentou uma queda brusca entre o sétimo e o oitavo dia de suspensão de rega, indo de potenciais próximos ao do controle até um potencial mais negativo que o  $MT_{RC}$  (Figura 5F).



**Figura 5** - Acúmulo diferencial de prolina em linhagens transgênicas da cultivar Micro-Tom. Conteúdo de prolina e potencial hídrico foliar em linhagens transgênicas *35S::PS* (A e B), *35S::nahG* (C e D) e em *35S::CKX2* (E e F) submetidas ao déficit hídrico por suspensão de rega de 8 dias. Barras representam o desvio padrão (n=3)

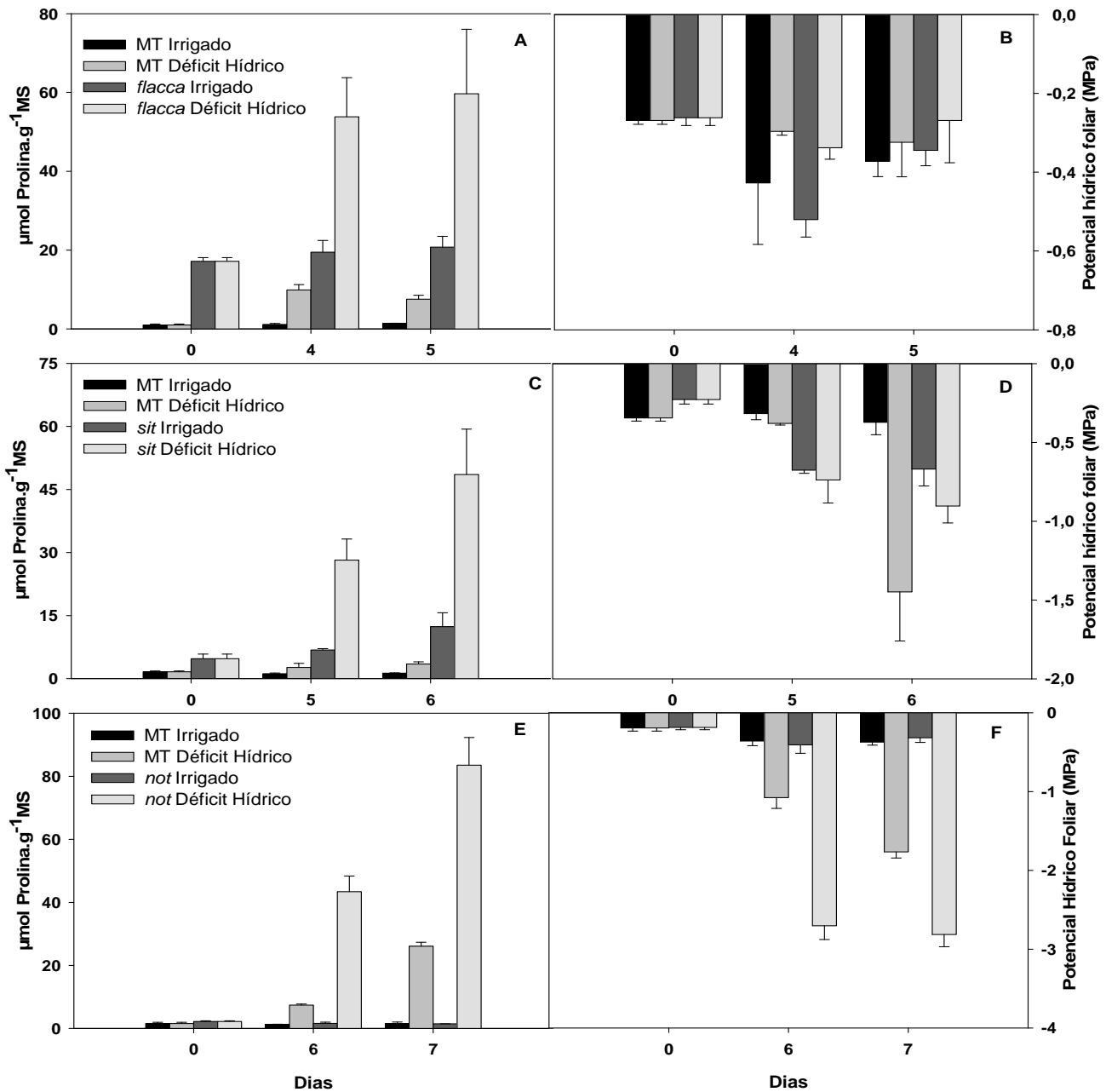
O acúmulo de prolina e o potencial hídrico foliar não diferiram entre os genótipos *35S::asCCD7* (reduzido nível de estrigolactona) e MT<sub>RC</sub>. Entre os mutantes hormonais, os de giberelina (*procera*), de auxina (*dgt*) e de etileno (*Never ripe*) não apresentaram diferença no acúmulo de prolina com o déficit hídrico quando comparado com o MT. Porém, o potencial hídrico de *Never ripe* permaneceu elevado com o estresse. Já em *dgt* e *procera* foram encontrados valores de potenciais mais negativos que os encontrados em MT (Apêndice B).

Todos os mutantes de ácido abscísico apresentaram reduzida resistência ao déficit hídrico. Porém, o genótipo *flacca* foi o que apresentou uma dessecação mais rápida, observada visualmente, mas não evidenciada nas medidas de potencial hídrico foliar (Figura 6A e 6B). Por este motivo, o genótipo *flacca* foi coletado antecipadamente, seguidos de *sitiens* e *notabilis*, que apresentaram uma resistência maior que *flacca*.

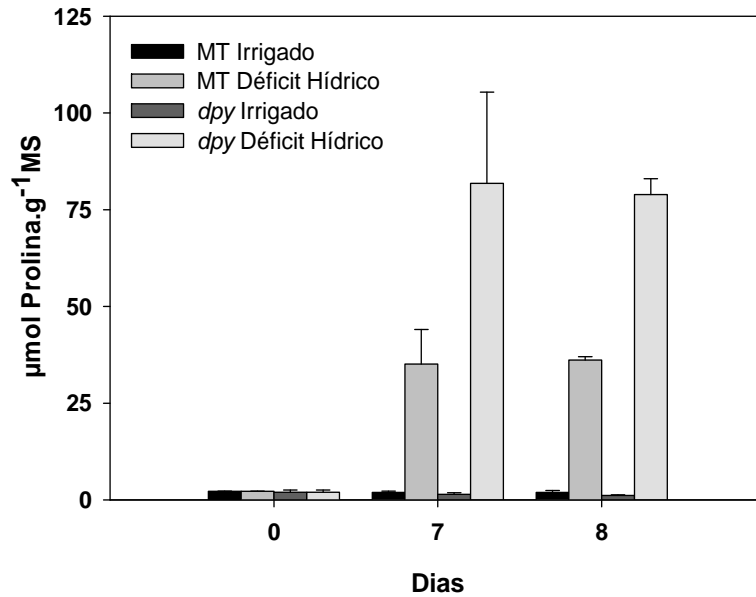
Entretanto, todos os mutantes de ácido abscísico responderam ao déficit hídrico com um aumento expressivo do conteúdo de prolina, quando comparado ao MT. O mutante *notabilis* foi o que mais acumulou prolina e apresentou reduzidos potenciais hídricos (Figura 6E e 6F). Já o mutante *sitiens* foi o que apresentou um menor acúmulo de prolina (Figura 6C) enquanto o seu potencial hídrico comportou-se de maneira similar ao *flacca* (Figura 6D). Foi observado no mutante *flacca* um acúmulo de prolina intermediário entre o *sitiens* e o *notabilis* (Figura 6). Por possuir um nível de prolina elevado já em condições controles, o aumento no acúmulo de prolina em *flacca* foi reduzida quando submetido ao déficit hídrico (Figura 6A).

O mutante de brassinosteróide (*dpy*) comportou-se de maneira similar aos mutantes de ABA sob déficit hídrico. Este teve seu nível de prolina aumentado, porém com menor expressividade, já que acumulou aproximadamente 2,3 vezes mais que o MT (Figura 7). No entanto, seu potencial hídrico foliar não pôde ser mensurado em câmara de Scholander devido ao reduzido tamanho da folha.

Devido à secagem diferencial do substrato entre vasos com mutantes e transgênicos diferentes, os genótipos MT, utilizados como controle no mesmo vaso de cada mutante, tiveram seu conteúdo de prolina alterado em dias iguais de coleta por se encontrarem em substratos com diferentes potenciais hídricos, dificultando a análise dos resultados como pode ser observado (Figuras 5 e 6).



**Figura 6** - Acúmulo diferencial de prolina em mutantes de ABA da cultivar Micro-Tom. Conteúdo de prolina e potencial hídrico foliar em *flacca* (A e B), *sitiens* (C e D) e *notabilis* (E e F) submetidos ao déficit hídrico por suspensão de rega por tempos variáveis. Barras representam o desvio padrão (n=3)



**Figura 7** – Acúmulo diferencial de prolina em mutante de brassinosteróide da cultivar Micro-Tom. Conteúdo de prolina em *dpy* submetidos ao déficit hídrico por suspensão de rega de 8 dias. Barras representam o desvio padrão (n=3)

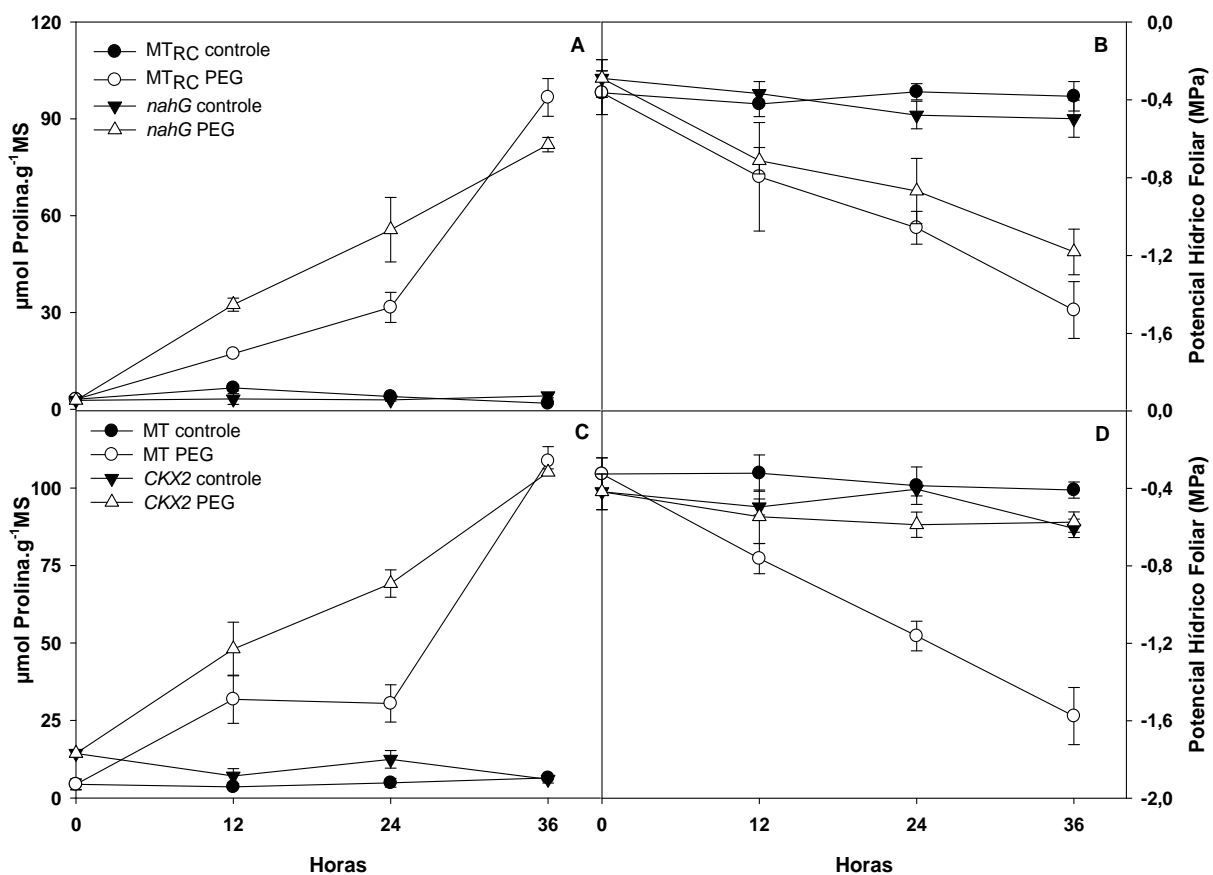
### 5.3. Acúmulo de prolina em mutantes e linhagens transgênicas hormonais de Micro-Tom submetidos a um estresse osmótico severo

Devido ao problema da progressão e a severidade do déficit hídrico ter sido diferente entre os materiais nos experimentos de suspensão de rega, foi utilizado PEG-6000 em solução nutritiva com o objetivo de expor todos os genótipos a um potencial hídrico idêntico e simultâneo. Neste experimento PEG foi adicionado para se alcançar um  $\Psi_w$  de -1,2 MPa. Cinco genótipos que apresentaram alguma resposta diferencial no acúmulo de prolina no experimento anterior, de suspensão de rega, foram selecionados. Foram eles: *35S::nahG*, *35S::PS*, *35S::CKX2* e *sitiens*, juntamente com os dois controles, o MT para os mutantes e o MT<sub>RC</sub> para os transgênicos.

Foram excluídos dois genótipos de ABA neste experimento, o *flacca* e o *notabilis*, permanecendo o *sitiens*. O *flacca* foi excluído por se apresentar excessivamente sensível à seca e com níveis de prolina altos mesmo no controle, o que dificulta tanto a realização dos experimentos quanto a análise dos resultados. O *notabilis* foi excluído por ser o mutante de ABA menos severo, ou seja, com maiores níveis endógenos deste hormônio. O mutante *dpy*, de brassinosteróide, foi excluído por ser muito pequeno, dificultando análises como a determinação de potencial hídrico foliar e atividade de enzimas e expressão de genes.

Conforme esperado, MT e MT<sub>RC</sub> apresentaram comportamentos iguais quanto ao acúmulo de prolina e potencial hídrico foliar, quando submetidos a estresse osmótico de -1,2 MPa (Apêndice C).

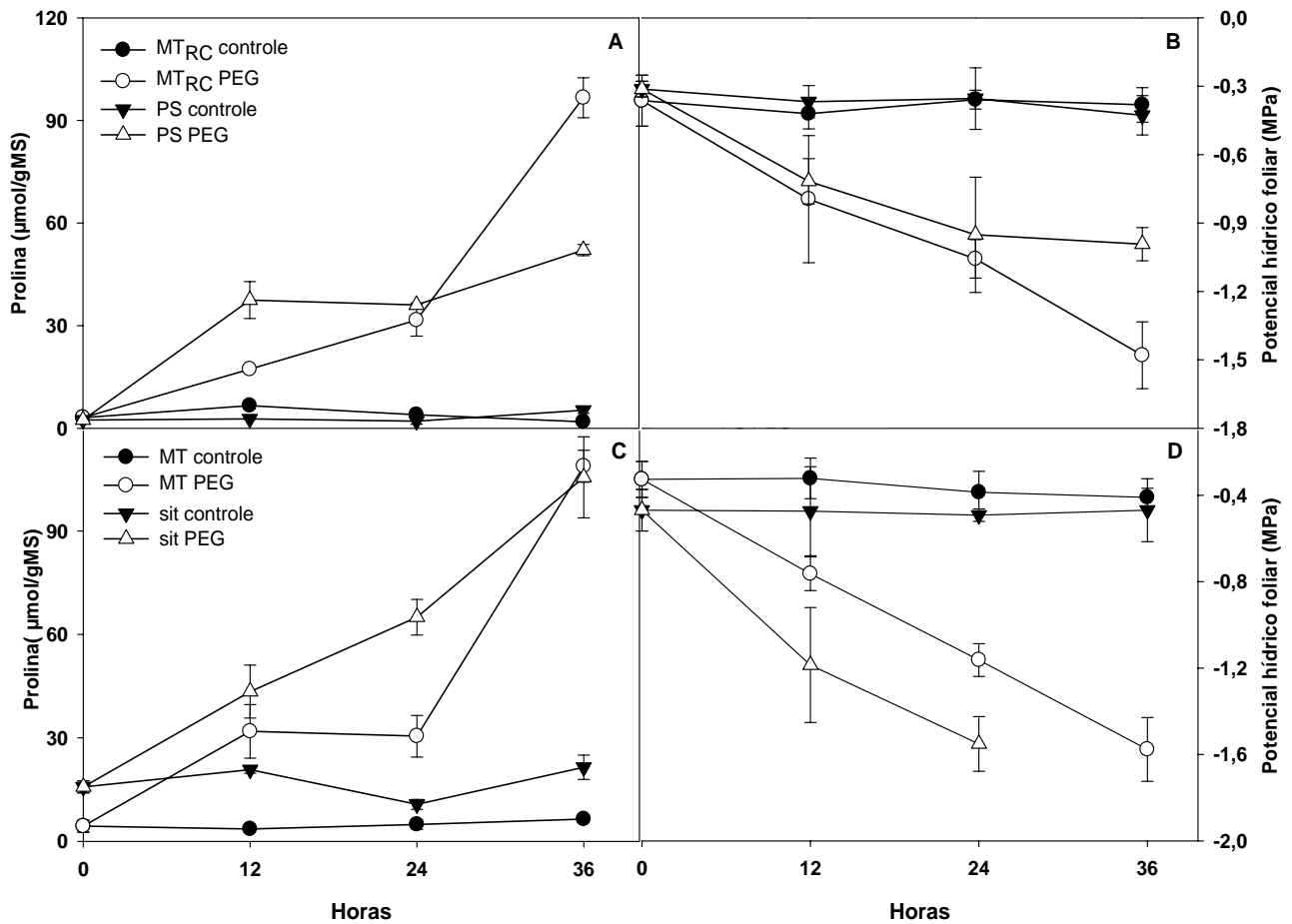
O genótipo *35S::nahG* comportou-se diferente do MT<sub>RC</sub> quanto ao acúmulo de prolina quando tratado com PEG. Após 12 e 24 h de estresse, esse transgênico apresentou elevado conteúdo de prolina, quando comparado com o MT<sub>RC</sub>. No entanto, após 36 h de estresse, o *35S::nahG* apresentou um acúmulo de prolina um pouco inferior (17,8%), mas significativo, do que o MT<sub>RC</sub> (Figura 8A).



**Figura 8** - Acúmulo de prolina em genótipos de Micro-Tom em resposta a um potencial hídrico de -1,2 MPa. Conteúdo de prolina e potencial hídrico foliar nas linhagens transgênicas *35S::nahG* (A e B) e *35S::CKX2* (C e D) submetidas a PEG em um potencial hídrico de -1,2 MPa durante 36 h. Barras representam o desvio padrão (n=3)

O comportamento do acúmulo de prolina no genótipo *35S::PS* sob estresse osmótico foi similar ao ocorrido com o *35S::nahG*, mas as diferenças em relação ao  $MT_{RC}$  foram mais acentuadas. Foi observado um aumento no conteúdo de prolina nas primeiras 12 h que permaneceu constante até 24 h e depois ao longo do tempo, com um ligeiro aumento as 36 h. Já o *35S::PS*, teve um acúmulo de prolina maior que  $MT_{RC}$  às 12 h, este conteúdo foi sendo acumulado até alcançar os níveis de *35S::PS* às 24 h ultrapassando os níveis de *35S::PS* às 36 h em 85% do conteúdo de *35S::PS* (Figura 9A). O seu potencial hídrico permaneceu mais elevado durante todo o tempo, porém uma maior diferença foi encontrada após 36 h de estresse (Figura 9B).

O transgênico *35S::CKX2* já possui níveis mais elevados de prolina em condições controle quando comparado com o MT. Este maior conteúdo de prolina em *35S::CKX2* também foi observado quando as plantas foram submetidas ao PEG, mas os níveis se igualaram após 36 h de estresse (Figura 8C).



**Figura 9** - Acúmulo de prolina em genótipos de Micro-Tom em resposta a um potencial hídrico de -1,2 MPa. Conteúdo de prolina e potencial hídrico foliar na linhagem transgênica *35S::PS* (A e B) e em mutantes *sitiens* (C e D) submetidos a PEG em um potencial hídrico de -1,2 MPa durante 36 h. Barras representam o desvio padrão (n=3)

O genótipo *sitiens* teve um comportamento semelhante ao transgênico *35S::CKX2* ao longo do tempo, com conteúdos de prolina acumulados em PEG similares aos observados em déficit hídrico. Assim como em *35S::CKX2*, o genótipo *sitiens* apresentou um nível endógeno de prolina maior do que em MT em condições controles, o qual não foi observado no experimento com suspensão de rega (Figura 9C). Em *sitiens*, o potencial hídrico sempre permaneceu reduzido quando comparado a MT, até que potenciais muito negativos foram atingidos e medidas na câmara de Scholander foram impedidas de serem realizadas. (Figura 9D).

#### **5.4. Acúmulo de prolina em mutantes e linhagens transgênicas hormonais de Micro-Tom submetidos a um estresse osmótico moderado**

Para imposição de um estresse osmótico moderado foi aplicado PEG em solução nutritiva para se alcançar um  $\Psi_w$  de -0,8 MPa. Neste experimento foram escolhidos somente os genótipos *35S::PS* e *sitiens*. O genótipo *35S::PS* foi escolhido por ter apresentado uma aparente resistência ao estresse osmótico no experimento com potencial hídrico de -1,2 MPa, evidenciado pelo potencial hídrico mais elevado, o seu aspecto visual e pelo acúmulo diferencial de prolina. Já o mutante *sitiens* foi escolhido pelo acúmulo diferencial de prolina e pela participação do ABA em plantas sob estresse hídrico.

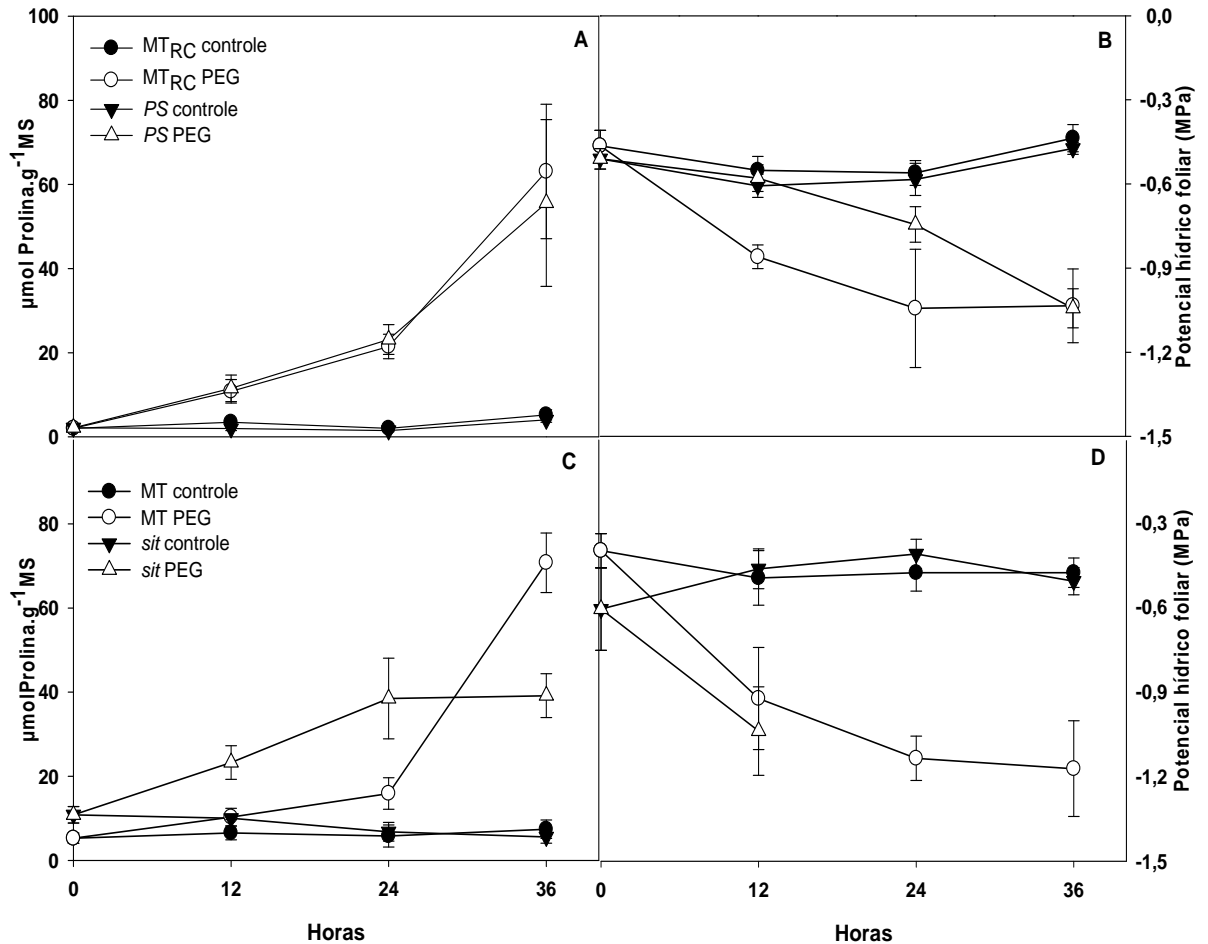
Assim como no experimento anterior, foram utilizados o MT como controle para o genótipo *sitiens* e o  $MT_{RC}$  para o *35S::PS*. Semelhante ao experimento anterior, estes dois genótipos controles tiveram acúmulos de prolina e valores de potenciais hídricos similares, não apresentando diferenças quanto a estes dois parâmetros avaliados.

Diferentemente do que ocorreu no experimento com estresse severo, o genótipo *35S::PS* submetido a um potencial de -0,8 MPa teve seu acúmulo de prolina semelhante ao  $MT_{RC}$  (Figura 10A). Porém, o seu potencial hídrico foliar foi mais elevado, menos negativo, em até 24 h, igualando seus valores a  $MT_{RC}$  em 36 h (Figura 10B).

Já o genótipo *sitiens* apresentou um acúmulo elevado de prolina no início do estresse até as 24 h e posteriormente este acúmulo manteve-se constante. Após 36 h de estresse o MT obteve um acúmulo superior ao de *sitiens* (Figura 10C). O mutante *sitiens* por ter baixa resistência à seca, perde água facilmente dos seus tecidos. Isso dificulta a medida do potencial hídrico, atingindo potenciais extremamente baixos, o que impede a realização de leituras precisas, como ocorrido no experimento anterior com potencial de -1,2 MPa, (Figura 10D).



Novamente, foram observados comportamentos iguais quanto ao acúmulo de prolina e de potencial hídrico foliar em MT e MTRC quando submetidos a um potencial de -0,8 MPa, da mesma forma que o encontrado no experimento a -1,2 MPa (Apêndice C).



**Figura 10** -Acúmulo de prolina em genótipos de Micro-Tom em resposta a um potencial hídrico de -0,8 MPa. Conteúdo de prolina e potencial hídrico foliar na linhagem transgênica *35S::PS* (A e B) e em mutantes *sitiens* (C e D) submetidos a PEG em um potencial hídrico de -0,8 MPa durante 36 h. Barras representam o desvio padrão (n=3)

### 5.5. Ação da prosisteminina e do ácido jasmônico no acúmulo e nas atividades das enzimas de biossíntese e degradação da prolina

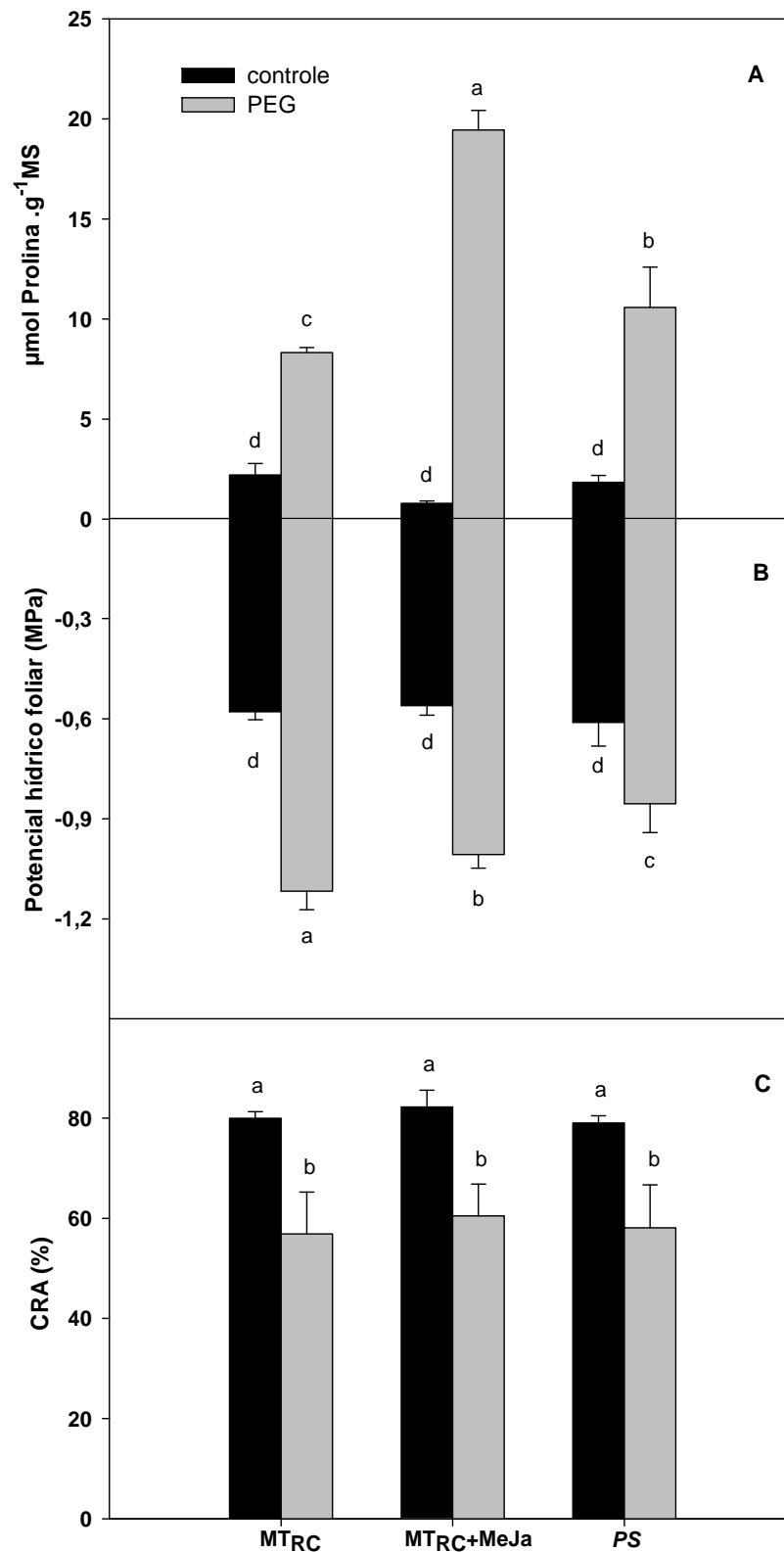
Foi observada uma redução do potencial hídrico em plantas submetidas ao estresse osmótico. No entanto, a aplicação exógena de MeJa ao MT<sub>RC</sub> aumentou o potencial significativamente em comparação ao MT<sub>RC</sub> sem aplicação. O genótipo *35S::PS*, conhecido por ter elevados níveis de ácido jasmônico endógeno, apresentou maior potencial hídrico

foliar tanto quando comparado ao  $MT_{RC}$  quanto ao  $MT_{RC} + MeJa$ , sob condições de estresse osmótico. Já em condições controles, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 11B). Apesar das diferenças encontradas em  $\Psi_w$  foliar, o CRA não apresentou diferenças entre os tratamentos (Figura 11C).

Com a imposição do estresse, o conteúdo de prolina foi elevado em todos os tratamentos. O conteúdo de prolina no genótipo *35S::PS* aumentou 27% a mais do que o controle  $MT_{RC}$ , diferença estatisticamente significativo. No entanto, o acúmulo de prolina foi maior ainda em  $MT_{RC}$  com aplicação exógena de MeJa, apresentando um conteúdo de prolina 2,3 vezes maior do que o  $MT_{RC}$  sem aplicação de MeJa (Figura 11A). O interessante é que estes maiores teores de prolina não foram associados com decréscimos no  $\Psi_w$  foliar. Diferenças no conteúdo de prolina não foram encontradas entre os tratamentos em condições controle.

Diferentemente do que ocorreu com o conteúdo de prolina, houve diferença na atividade de P5CS em condições controle, sem imposição de estresse. A aplicação de MeJa exógeno induziu a atividade de P5CS em 3,5 vezes. Já no genótipo *35S::PS*, a atividade foi aumentada em cerca de 2,7 vezes, quando comparadas ao genótipo  $MT_{RC}$  (Figura 12A).

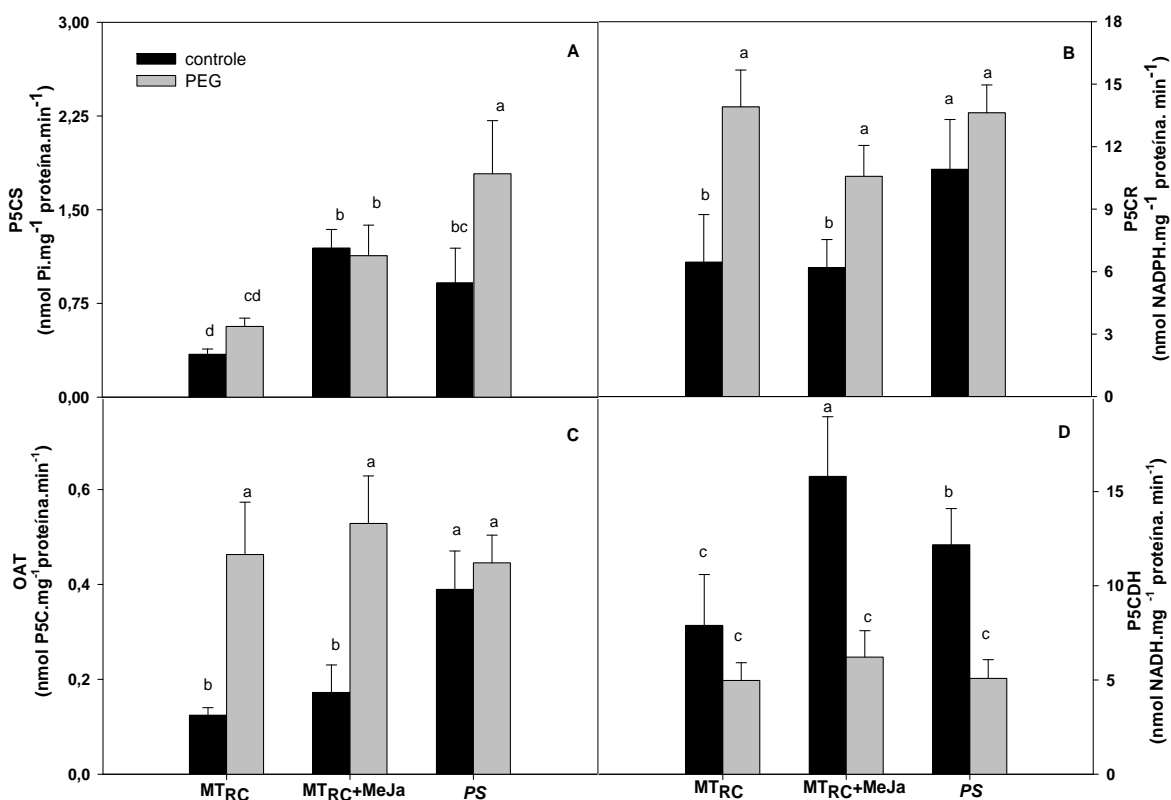
Com a imposição do estresse osmótico, a atividade de P5CS apresentou uma tendência de aumento em  $MT_{RC}$ , mas que não foi estatisticamente significativo. De modo semelhante, em  $MT_{RC} + MeJa$  exógeno a atividade de P5CS sob condições de estresse não foi maior do que o controle irrigado. Mesmo assim, a atividade de P5CS em  $MT_{RC} + MeJa$  exógeno, em condições de estresse osmótico, foi 2 vezes maior do que em  $MT_{RC}$  sem aplicação de MeJa exógeno. Já no genótipo *35S::PS*, a atividade de P5CS foi fortemente induzida com o estresse osmótico, praticamente dobrando e sendo cerca de 3,2 vezes mais alto do que  $MT_{RC}$  (Figura 12A). A atividade de OAT foi aumentada em plantas submetidas ao estresse osmótico, comparado com o controle irrigado, com exceção do genótipo *35S::PS*, onde a atividade desta enzima já era bastante elevada no controle irrigado. Em  $MT_{RC}$ , a atividade de OAT foi fortemente induzida com o PEG, aumentando cerca de 3,7 vezes, diferentemente do que ocorreu com a atividade de P5CS. Não houve diferença significativa na atividade de OAT entre os diferentes materiais sob estresse osmótico. Porém, em condição controle irrigado, a OAT estava bem mais ativa no genótipo *35S::PS*, com atividade 3,1 e 2,3 vezes maior do que o  $MT_{RC}$  e o  $MT_{RC} + MeJa$  exógeno, respectivamente (Figura 12C).



**Figura 11-** Acúmulo de prolina em resposta a pro sistemina e ao metil jasmonato. Conteúdo de prolina (A), potencial hídrico foliar (B) e conteúdo relativo de água (C) em folhas de *MT<sub>RC</sub>*, *MT<sub>RC</sub>* com aplicação exógena de 100  $\mu\text{M}$  de MeJa e de transgênico *35S::PS* submetidos a PEG em um potencial hídrico de -1,2 MPa durante 12 h. Barras representam o desvio padrão (n=3)

A atividade de P5CR se comportou de modo bastante semelhante à atividade de OAT. O aumento da atividade de P5CR foi expressivo com a aplicação de PEG, com exceção do genótipo *35S::PS*, onde a atividade desta enzima não aumentou significativamente. Este último apresentou elevada atividade de P5CR já em condição controle irrigado, cerca de 70% a mais do que  $MT_{RC}$  e  $MT_{RC} + MeJa$ , que apresentaram valores semelhantes. Em condição de estresse osmótico, não foi observada diferença na atividade de P5CR entre os materiais (Figura 12B).

Enquanto as atividades das enzimas de biossíntese foram induzidas, a atividade de P5CDH, enzima do catabolismo de prolina, foi reprimida com a imposição do estresse osmótico por PEG. Em  $MT_{RC}$ , esta redução foi de aproximadamente 37%. Nestas condições, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Porém na condição controle, a aplicação do MeJa exógeno em  $MT_{RC}$  aumentou em 2 vezes a atividade da enzima P5CDH, enquanto que no genótipo *35S::PS* esse aumento foi menos expressivo e em torno de 54%, e também estatisticamente significativo (Figura 12 D).



**Figura 12** - Atividade das enzimas de síntese e catabolismo de prolina em resposta a prosistemia e metil jasmonato. Atividades de P5CS (A), P5CR (B), OAT (C) e P5CDH (D) em folhas de  $MT_{RC}$ ,  $MT_{RC}$  com aplicação exógena de 100  $\mu$ M de MeJa e da linhagem transgênica *35S::PS* submetidos a PEG em um potencial hídrico de -1,2 MPa durante 12 h. Barras representam o desvio padrão (n=3)

## 5.6. Dependência do MeJa por ABA no acúmulo e nas atividades das enzimas de biossíntese e catabolismo da prolina

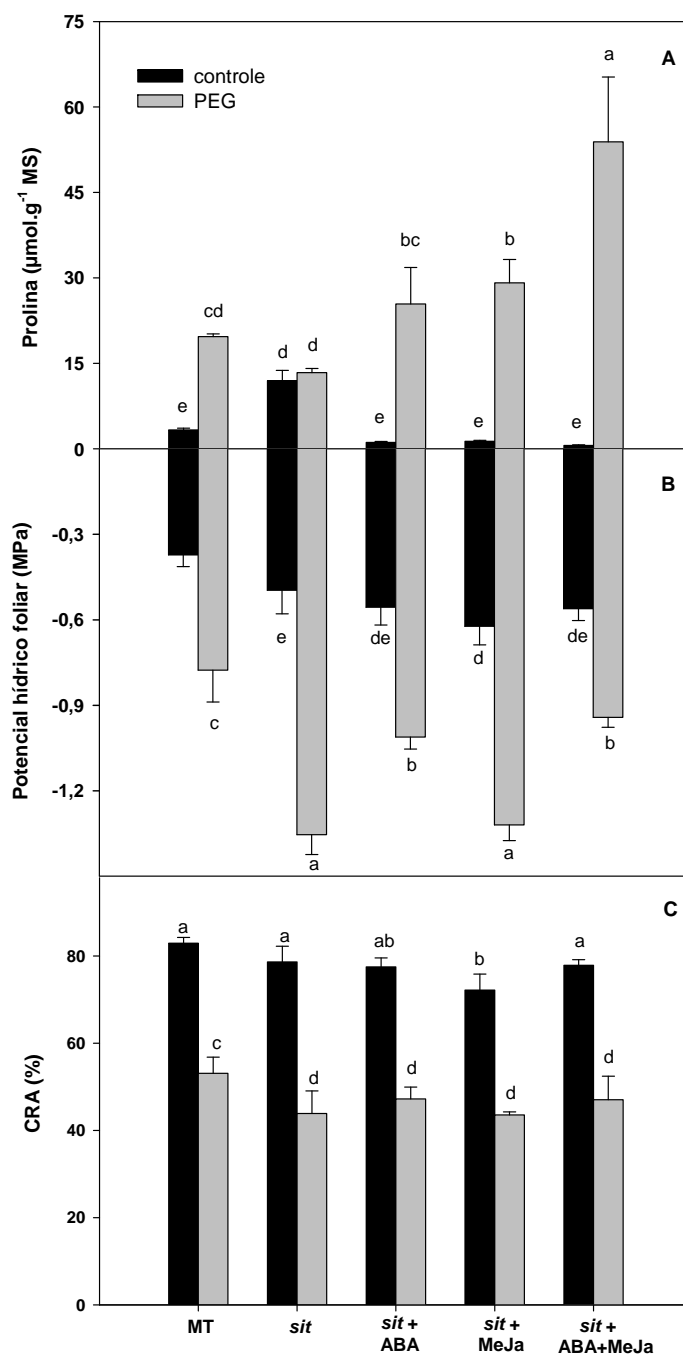
O estresse osmótico causou uma redução no potencial hídrico foliar, após 12 horas de tratamento com PEG, em todos os tratamentos. Porém, em MT e *sitiens* pulverizados com ABA somente e em ABA+ MeJa, o potencial teve uma menor redução, quando comparado ao *sitiens* e ao *sitiens* pulverizado com MeJa. Já em condições controles, a pulverização dos hormônios não afetou o potencial hídrico foliar de genótipos de *sitiens*, tendo este genótipo um potencial hídrico mais negativo independente do tratamento (Figura 13B).

Um aumento expressivo no conteúdo de prolina foi observado no genótipo MT e nos mutantes de *sitiens* pulverizados com hormônios quando submetidas ao tratamento com PEG quando comparado ao controle. Em *sitiens*, a aplicação de ABA contribuiu com um aumento de 1,9 vezes no conteúdo de prolina, enquanto que o MeJa elevou cerca de 2,2 vezes o nível de prolina.. No entanto, os maiores valores foram observados em *sitiens* pulverizados com ABA e MeJa, com um aumento expressivo de quatro vezes (Figura 13A).

Em *sitiens*, sem aplicação de hormônio exógeno, não foi verificado um incremento de prolina sob estresse osmótico. Entretanto, nestes mutantes foi observado um elevado nível de prolina endógena, cerca de 3,6 vezes maior que o MT, em condições controles, o que não foi encontrado em nenhum dos outros tratamentos (Figura 13A).

A aplicação de ABA em *sitiens* sob estresse osmótico foi eficiente no acúmulo de prolina, com uma média relativamente acima do MT, mas não significativa. No entanto, a aplicação de ABA e MeJa superou 2,7 vezes as concentrações encontradas em MT (Figura 13A).

De maneira geral, a atividade de P5CS foi pouco induzida ou mesmo reprimida sob estresse osmótico nos tratamentos, quando comparado a condições controle, com exceção do tratamento com pulverização de MeJa em *sitiens*. A aplicação de ABA induziu 3,2 vezes, enquanto que a aplicação de MeJa induziu a P5CS cerca de 4,7 vezes quando submetidas ao PEG. Intrigantemente, na presença de ABA e MeJa, a atividade de P5CS foi afetada e reduzidas a níveis de MT, sob estresse osmótico (Figura 14A). Foi observado que a pulverização de ABA e de MeJa, em *sitiens*, afetou a atividade de P5CS em condições controles. A atividade de P5CS foi induzida cerca de 95 % na presença de ABA e cerca de 77% na presença de MeJa e a na presença dos dois hormônios a P5CS teve sua atividade aumentada em 2,4 vezes. Os reduzidos níveis de ABA em *sitiens* não alteraram a atividade de P5CS em condições controles, quando comparado ao MT (Figura 14A).



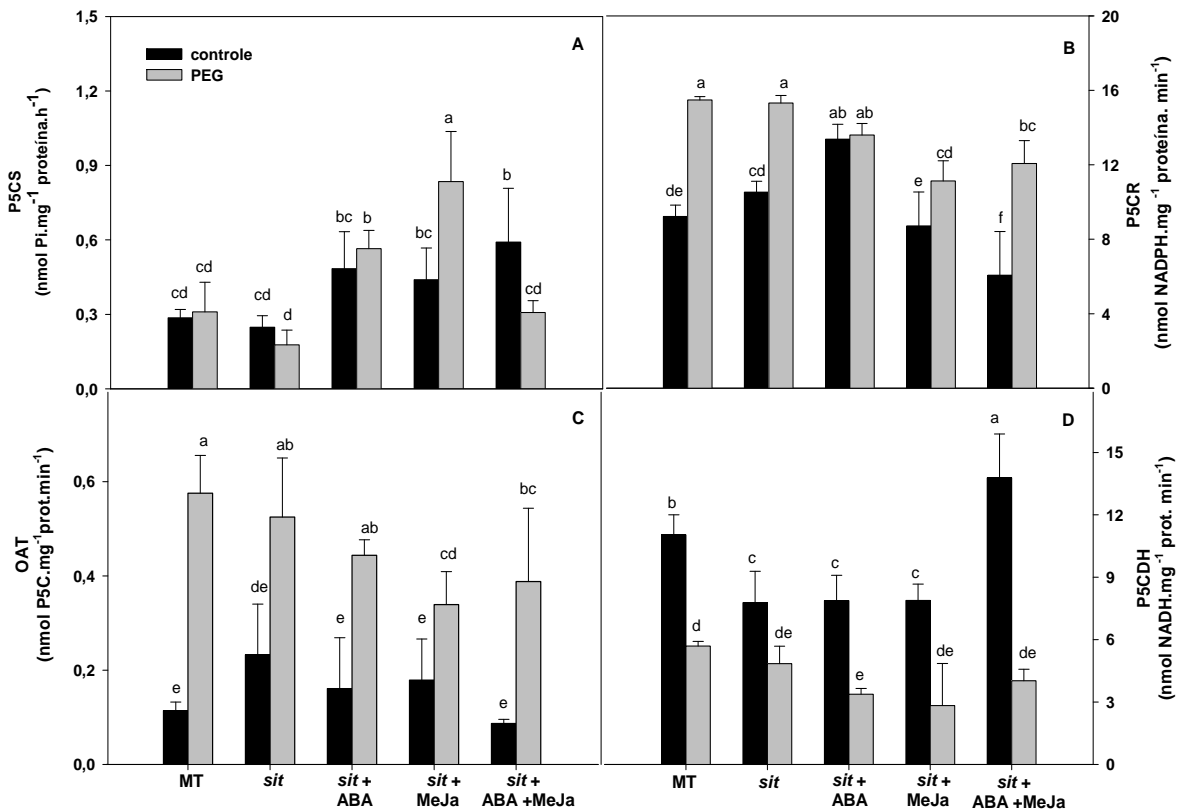
**Figura 13**– Acúmulo de prolina no mutante *sitiens* em resposta à aplicação exógena de ácido abscísico e metil jasmonato. Conteúdo de prolina (A), potencial hídrico foliar (B) e conteúdo relativo de água (C) em folhas de Micro-Tom e em mutantes *sitiens* com aplicação exógena de 100 µM de ABA, 100 µM de MeJa e 100 µM de ABA + 100 µM de MeJa submetidos a PEG em um potencial hídrico de -1,2 MPa durante 12 h. Barras representam o desvio padrão (n=3)

A elevação da atividade enzimática da OAT, enzima da via alternativa de biossíntese, foi observada em todos os tratamentos sob estresse osmótico, quando comparada com as condições controles respectivas. Houve uma maior atividade de OAT em MT sob estresse osmótico, do que em *sitiens* com ou sem aplicação exógena de hormônios. No entanto, a

maior redução da atividade de OAT foi obtida com a aplicação de MeJa com uma inibição de 35,4% (Figura 14C).

Não houve alterações na atividade em condições controles entre os tratamentos. Entretanto, houve um incremento de cerca de 2 vezes na atividade de OAT em *sitiens*, comparado ao MT, porém não houve diferença significativa (Figura 14C).

Plantas submetidas ao tratamento com PEG tiveram sua atividade de P5CR elevada, quando comparada a condições controles, com exceção do *sitiens* pulverizado com ABA. Porém, mutantes de *sitiens* submetidos a aplicação de MeJa tiveram a atividade de P5CR reduzida em 27,3%, sendo diferente significativamente. Uma indução de 27% na atividade de P5CR foi encontrada em mutantes de *sitiens* pulverizados com ABA em condições controles (Figura 14B).



**Figura 14 -** Atividade das enzimas de síntese e catabolismo de prolina no mutante *sitiens* em resposta ao ácido abscísico e ao metil jasmonato. Atividades de P5CS (A), P5CR (B), OAT (C) e P5CDH (D) em folhas de Micro-Tom e em mutantes *sitiens* com aplicação exógena de 100  $\mu$ M de ABA, 100  $\mu$ M de MeJa e 100  $\mu$ M de ABA + 100  $\mu$ M de MeJa submetidos a um potencial hídrico de -1,2 MPa durante 12 h. Barras representam o desvio padrão (n=3)

A atividade de P5CDH, a enzima da segunda etapa do catabolismo da prolina, foi reduzida em todas as plantas submetidas ao estresse osmótico. Sob estresse osmótico, foi observado uma redução de 40,7% na atividade de P5CDH, com diferença significativa, em *sitiens* pulverizados com ABA, quando comparado ao MT. Já em condições controle, uma maior atividade foi observada em *sitiens* com aplicação de ABA e MeJa exógeno, com uma indução de P5CDH em cerca de 77 %, quando comparado ao *sitiens* sem aplicação de hormônios (Figura 14D).



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. O acúmulo de prolina é bem correlacionado com o potencial hídrico foliar e com o conteúdo relativo de água em Micro-Tom sob déficit hídrico

O tomateiro é uma espécie exigente quanto à água no solo. A demanda máxima hídrica ocorre no período de floração e crescimento de frutos. Em estádios iniciais de déficit hídrico, as plantas reduzem seu tamanho por meio da redução do crescimento e número de folhas com o objetivo de minimizar a perda excessiva de água (CHAVES; OLIVEIRA, 2004). Quando a desidratação é rápida, as plantas usam diferentes mecanismos para reduzir a perda de água por transpiração, como por exemplo, o fechamento estomático.

A variedade Micro-Tom (MT) parece apresentar um comportamento estomático bastante restritivo sob estresse hídrico, o que pode dificultar a observação do status hídrico da planta através da condutância estomática e transpiração, consideradas estas medidas não destrutivas. Foi observado que a condutância estomática na variedade de MT foi reduzida drasticamente com poucos dias de estresse, atingindo valores aproximadamente 10 vezes menores que valores encontrados em plantas sob condições irrigadas em 5 dias sob déficit hídrico. Já Carvalho et al. (2011), encontrou uma queda da condutância estomática de aproximadamente 4 vezes no segundo dia de estresse hídrico em MT. Como consequência desta redução da condutância estomática, a transpiração também é reduzida em proporções similares.

Diferenças são encontradas quanto ao comportamento da abertura estomática entre espécies vegetais. Mecanismos rápidos de fechamento estomático podem reduzir o decaimento do potencial hídrico, no início do déficit hídrico. Porém, uma consequência imediata é a redução da absorção de CO<sub>2</sub>, sendo que, quanto mais prolongado for o fechamento estomático, menor será a fotossíntese da planta (BEERLING; ROYER, 2011).

O potencial hídrico foliar está relacionado com a condutância estomática, embora nem sempre eles comportam-se de maneiras similares. Diferentemente do que ocorreu com a condutância, o potencial hídrico foliar em MT foi sendo reduzido gradativamente com o avanço do estresse hídrico atingindo potenciais abaixo de -1,6 MPa. O mesmo comportamento foi encontrado para o CRA, onde em plantas de MT submetidas a um déficit hídrico tiveram seu CRA reduzidos em 38,26% quando comparadas com plantas irrigadas. Lafitte (2002) classifica estresse hídrico severo como aquele em que o CRA esteja abaixo de 20% do encontrado em plantas irrigadas ou com potencial hídrico foliar abaixo de -1,5 MPa.

Segundo esta classificação, o déficit hídrico aplicado pode ser considerado como severo. Este nível de estresse pode ter sido atingido provavelmente pela rápida perda de água da mistura utilizada que apresentou uma textura arenosa. Talvez, este seja o motivo da presença de vazamento de eletrólitos elevada a partir do quinto dia, apesar de ter sido um estresse gradativo.

Sabe-se que o acúmulo de prolina responde à dessecação (CHIANG; DANDEKAR, 1995). O conteúdo de prolina foi sendo acumulado gradativamente em MT, com o avanço do tempo de suspensão de rega. Desta maneira, o potencial hídrico e o CRA puderam ser correlacionados, embora inversamente, com o acúmulo de prolina e foram utilizados em experimentos posteriores, apesar de serem métodos destrutivos, já que a redução da condutância e a transpiração são anteriores ao acúmulo de prolina.

## **6.2. Genótipos hormonais sob déficit hídrico respondem diferencialmente quanto ao acúmulo de prolina**

Pouco é conhecido sobre a relação entre diferentes hormônios e o acúmulo de prolina. Apesar da imensa disponibilidade de mutantes e transgênicos hormonais, a maioria dos trabalhos concentram seus estudos na aplicação exógena do hormônio em plantas não mutantes. A única exceção encontrada é a excessiva quantidade de trabalhos com mutantes de ABA, já que este é conhecido por participar ativamente na resposta ao estresse hídrico. Mais escasso ainda é a participação de diferentes mutantes hormonais na resposta ao acúmulo de prolina.

Alguns trabalhos relatam o acúmulo de prolina em função da aplicação exógena de algum hormônio, como descrito para brassinosteróides (ABRAHAM et al., 2003), ácido salicílico (YOSHIBA et al., 1995; SHAKIROVA et al., 2003), citocinina (STEWART; VOETBERG; RAYAPATI, 1986). Porém, neste caso a prolina pode ou não estar sendo acumulada em resposta a elevados níveis do hormônio que pode ocasionar uma possível disfunção do metabolismo celular. Assim, o uso de mutantes e transgênicos com reduzidos níveis de um determinado hormônio como ferramenta experimental, pode ajudar na análise da causa/efeito das respostas.

Entre os vários hormônios, o ácido abscísico é o mais amplamente envolvido em respostas aos estresses abióticos como a seca, baixa temperatura e o estresse osmótico. Estudos têm mostrado que o aumento nos níveis de ABA limita a perda de água através da

transpiração, reduzindo a abertura estomática, além do envolvimento em outros aspectos de aclimatação ao estresse (TARDIEU; DAVIES, 1992).

Devido a este papel fundamental e a outros do ABA, e por ser a prolina um aminoácido acumulado em diferentes espécies sob seca, todos os mutantes de ABA responderam ao déficit hídrico acumulando prolina. Em *Arabidopsis*, mutantes deficientes ou insensíveis de ABA não acumulam prolina ao nível do tipo selvagem, sendo, portanto, o acúmulo de prolina dependente de ABA (VERSLUES; BRAY, 2006). No entanto, o presente trabalho mostra que o tomateiro apresenta uma resposta inversa e os mutantes deficientes em ABA acumularam prolina em níveis mais elevados que o próprio tipo selvagem.

O potencial hídrico dos mutantes de ABA *sitiens* e *flacca*, não foi reduzido com o estresse aplicado. Estes mutantes apresentaram reduzida resistência ao estresse, perdendo água rapidamente e apresentando necrose dentro de poucos dias de estresse. Este elevado potencial hídrico apresentado pode ter sido uma consequência do fenômeno de cavitação e o colapso das paredes do xilema, que libera água dos vasos xilemáticos com reduzidas pressões, durante a mensuração.

Apesar dos hormônios SA e BRs desempenharem um papel central na sinalização de estresse biótico a partir da infecção por patógenos, foi encontrada respostas de acúmulo diferenciado de prolina nos mutantes destas classes hormonais em resposta ao déficit hídrico. Mais interessante ainda, foi o elevado potencial hídrico alcançado por mutantes de SA quando comparados ao MT, mostrando uma relativa resistência ao déficit hídrico.

Assim, como SA e BRs, o JA participa da defesa vegetal frente a estresses bióticos. Considera-se que o transgênico utilizado neste estudo (*35S::PS*), tenha elevados níveis de JA, devido à presença de elevados níveis de sistemina, um ativador da biossíntese de JA. No entanto, não se sabe ao certo se as respostas advindas deste transgênico são devido à elevada quantidade de JA ou de sistemina, que é também considerado um peptídeo sinalizador. Porém estes transgênicos apresentaram um acúmulo reduzido de prolina, em tempos mais avançados de déficit hídrico quando comparados com o tipo selvagem.

O etileno tem sido considerado como um hormônio do estresse e é induzido por muitos destes (ABELES et al., 1992; MORGAN; DREW, 1997). Porém, neste estudo não foi encontrado nenhum tipo de resposta diferencial ao acúmulo de prolina no mutante de etileno, assim como em mutantes de hormônios conhecidos pela promoção do crescimento e desenvolvimento vegetal, como auxinas e giberelinas.

Já o transgênico de citocinina (*35S::CKX2*) apresentou respostas interessantes neste estudo, em que mutantes defectivos acumularam prolina a níveis bem superiores ao tipo

selvagem. Entretanto, já é conhecido que este grupo hormonal afeta os níveis de prolina na célula, mas não se sabe ao certo se as citocininas estimulam ou inibem o acúmulo de prolina. Os transgênicos de citocinina apresentaram um comportamento hídrico não típico de MT, em que um decréscimo gradativo no potencial hídrico é exibido, sendo o potencial hídrico de 35S::CKX2 reduzido drasticamente dentro de um dia sob déficit hídrico.

Apesar da possibilidade de comparação entre plantas mutantes e plantas do tipo selvagem contidas no mesmo vaso, há um certo impedimento na comparação de mutantes com portes muito diferentes. Ocorre que devido à diferença fenotípica encontrada entre os mutantes como altura, tamanho e espessura de folha, sistema radicular etc., houve uma desigualdade na secagem do substrato encontrado nos vasos, provavelmente devido a taxas transpiratórias diferentes entre os mutantes. Portanto, experimentos com suspensão de rega não se mostrou ideal para este tipo de abordagem experimental.

Existem alguns solutos, como o PEG, que tem a capacidade de reduzir o potencial hídrico do meio, que podem ser utilizados em estudos experimentais com plantas. Apesar de não ser um sistema ideal, pois apresenta riscos de toxidez, caso este seja levado via xilema para a parte aérea, o PEG é considerado um sistema onde o potencial hídrico do meio é controlado.

É conhecido que a prolina é acumulada em poucas horas de estresse (SHARMA; VERLUES, 2010). Com o objetivo de um maior acúmulo possível de prolina em 36 horas, foi aplicado um potencial hídrico considerado severo de -1,2 MPa, mas que é encontrado em diversos trabalhos (SHARMA; VERLUES, 2010; VERLUES; BRAY, 2006). Todos os genótipos submetidos ao estresse osmótico neste potencial responderam com um acúmulo de prolina diferenciado, evidenciando que alguns hormônios estão envolvidos de alguma forma na regulação do acúmulo de prolina. Porém, entre os genótipos, o transgênico 35S::PS foi o que mostrou um comportamento mais interessante, principalmente devido ao elevado potencial hídrico e sua reduzida acumulação de prolina exibido após 36 horas de estresse osmótico.

Segundo Orsni et al. (2010), plantas de tomateiro superexpressando prosisteminina submetidas à salinidade apresentam um potencial hídrico elevado e um fechamento estomático parcial como pré-adaptação a perda de água. No entanto, estes mecanismos não são dependentes de ABA ou de componentes da via de transdução de sinal por ABA. Segundo esses autores, o reduzido acúmulo de prolina seria mediado pela via de sinalização de ácido jasmônico, que induz a produção de proteínas de defesa em detrimento da produção de

hormônios e de prolina, que seriam utilizados como neutralizantes dos efeitos secundários da herbivoria.

A fim de verificar o comportamento dos genótipos *35S::PS* e *sitiens* em potenciais mais elevados, foi realizado um experimento com um potencial hídrico de -0,8 MPa. Porém, o comportamento do transgênico de prosistemina foi similar ao MT. Assim, o transgênico de prosistemina pareceu apresentar uma possível resistência em tempos mais avançados sob potenciais hídricos mais negativos. Recentes trabalhos tem mostrado a participação do ácido jasmônico no fechamento estomático, no acúmulo de prolina e na elevação do CRA (MUNEMASA et al., 2007; PERASSOLO et al., 2011; ANJUM et al., 2011). Desta maneira, possíveis evidências do ácido jasmônico são apresentadas na atuação da resistência a estresses abióticos.

Já mutantes de ácido abscísico, mesmo quando submetidos a um potencial mais elevado, apresentam murcha excessiva e margens foliares com necrose. Provavelmente, a morte celular seja a causa da estabilização do acúmulo de prolina em *sitiens* a -0,8 MPa. Como observado, a taxa de acúmulo de prolina por unidade de tempo é superior em plantas sob -1,2 MPa, e, como aparentemente não foi verificada diferença na área necrosada entre os diferentes potenciais, o acúmulo total em plantas submetidas a -0,8 MPa foi sendo reduzido com o avanço da morte do tecido até a estabilização.

### **6.3. Sistemina e ácido jasmônico estimulam o turnover de prolina em condições controle e aumentam o seu acúmulo com o estresse osmótico por inibição da sua degradação**

Sabe-se que a prosistemina leva a um acúmulo elevado de ácido jasmônico (JA), embora pouco é conhecido sobre seu papel em outras alterações do metabolismo (LI et al., 2003). Para examinar se a resistência ao estresse osmótico e o acúmulo diferenciado de prolina em transgênicos *35S::PS* pode ser explicado pelos seus elevados níveis de ácido jasmônico, ou se por outros mecanismos, foi realizado um experimento com aplicação exógena de MeJa em MT, com tratamento com PEG-6000 (-1,2 MPa) por 12 h. Foi verificado que a aplicação exógena de ácido jasmônico induziu o acúmulo de prolina sob estresse osmótico, mas que isto não ocorreu em condições controle. Assim como encontrado no experimento anterior com PEG a -1,2 MPa, o conteúdo de prolina no genótipo *35S::PS* também foi induzido após 12 h de estresse osmótico, porém este acúmulo não foi observado em condições controle (Figura 11A).

Conforme já tinha sido observado nos experimentos anteriores, sob estresse osmótico, o genótipo *35S::PS* manteve um  $\Psi_w$  foliar significativamente mais elevado do que MT (Figura 11B). A aplicação de MeJa em MT promoveu um aumento no potencial hídrico sob estresse, assim como aconteceu com o genótipo *35S::PS*, porém este aumento foi menor, mas estatisticamente significativo. No entanto, essas diferenças nos potenciais hídricos entre os tratamentos não foram observadas no CRA (Figura 11C). Anjum et al. (2011) observou um acúmulo de prolina acompanhado de um elevado CRA em plantas de soja com aplicação de MeJa, e sugeriu que maiores níveis de prolina poderiam ter ajudado na manutenção do elevado conteúdo de água encontrado no tecido.

Em resumo, sob condições de estresse, o ácido jasmônico exógeno induziu acúmulos elevados de prolina, enquanto isto ocorreu em menor proporção no transgênico de prosistemina (Figura 11A). No entanto, não se sabe ao certo se os menores níveis de prolina encontrados no genótipo de prosistemina em comparação ao tratamento com MeJa exógeno é devido à sistemina ou se é devido a diferenças nos níveis efetivos de ácido jasmônico entre as duas situações.

Após a análise da atividade das enzimas das vias de biossíntese de prolina deste experimento, é notável que tanto a prosistemina quanto o ácido jasmônico aumentaram a atividade de P5CS tanto em condições controles quanto sob estresse osmótico (Figura 12A). Em *Rubia tinctorum*, o aumento nos conteúdos de prolina pela aplicação de MeJa foi sugerido ser uma consequência da síntese via P5CS, a partir do aumento nos níveis de glutamato a partir da elevada atividade de GDH (PERASSOLO et al., 2011). Já Su et al. (2011), verificaram que existe um elemento de resposta no promotor dos genes de P5CS responsivo ao MeJa e que houve uma indução da expressão destes genes após a aplicação de 10  $\mu$ M de MeJa, mas que isto não resultou em aumento no acúmulo de prolina em condições controles. Foi sugerido pelos autores que o MeJa poderia estar atuando em outras vias contrárias a via de P5CS induzida, fazendo com que a prolina não fosse acumulada.

Nossos resultados corroboraram os de Su et al. (2011). Por outro lado, também sugerem uma explicação para a ausência de acúmulo de prolina na condição controle. Apesar da ausência de dados da atividade da enzima de catabolismo PDH em nosso trabalho, por sua determinação ser complexa, o reduzido acúmulo de prolina em condições controle pode ser explicado por um aumento na sua degradação, conforme evidenciado pela indução da enzima de degradação P5CDH (Figura 12D). Um aumento na degradação de prolina também é consistente com o relato de Walia et al. (2007) onde a aplicação de MeJa aumentou a expressão do gene de PDH em cevada e *Arabidopsis*. Assim, a síntese e a degradação de

prolina parecem ser estimuladas na presença de MeJa em condições controle provocando um aumento no “turnover” de prolina.

Plantas de MT com aplicação exógena de MeJa, assim como o genótipo 35S::PS sob 12 h de estresse osmótico apresentaram um acúmulo líquido de prolina, provavelmente pela indução da P5CS, e da acentuada repressão da P5CDH, que se encontrava com alta atividade em condições controles. Além disto, também devem ter contribuído para este aumento a indução de OAT e P5CR sob estresse (Figura 12B e C). Assim, o MeJa parece promover a indução do ciclo síntese/catabolismo de prolina sob condições controles, mas sem haver acúmulo de prolina. Com a imposição do estresse, a síntese parece ter sido maior através da indução das vias de síntese enquanto a degradação foi reduzida pela repressão da P5CDH resultando no acúmulo deste aminoácido.

Sob temperaturas baixas, frutos de nêpera tiveram elevado acúmulo de prolina em resposta a aplicação de MeJa exógeno. Juntamente com o aumento de prolina, houve a indução da atividade de P5CS, assim como o da OAT e a elevada repressão de PDH. Ou seja, o MeJa pareceu induzir a síntese de prolina e reduzir a degradação em frutos de nêpera, aumentando o conteúdo de prolina (CAO et al., 2012).

Já no transgênico de prosistemina houve uma maior indução de P5CS sob estresse. Uma particularidade deste genótipo é que em condições controles a OAT e a P5CR se encontram mais ativadas quando comparado tanto com o MT quanto MT + MeJa. Ou seja, a sistemina parece utilizar as duas vias de síntese de prolina, independente da presença de estresse. É possível que o menor acúmulo de prolina encontrado em prosistemina quando comparado ao MT com aplicação exógena de MeJa sob estresse osmótico, seja devido a menor repressão da via de degradação observada através da atividade enzimática de P5CDH.

Desta maneira, a avaliação das atividades enzimáticas não deve ser realizada somente em condições de estresse. Possíveis mecanismos de acumulação de prolina durante o estresse podem ser esclarecidos com a observação do comportamento das atividades enzimáticas em condições controle. Assim, MeJa e sistemina podem induzir um maior acúmulo de prolina sob estresse osmótico pela maior ativação das vias de síntese e degradação em condições controle e repressão da via de degradação sob estresse. Embora informações sobre a ação de MeJa sobre enzimas do metabolismo de prolina, consistentes com os dados deste trabalho, já tenham sido relatados na literatura, estas são fragmentadas, não permitindo uma visão mais completa nem uma explicação dos mecanismos envolvidos.

#### **6.4. A ação de ácido jasmônico sobre o $\Psi_w$ foliar é dependente de ABA enquanto que sua ação sobre o acúmulo de prolina é parcialmente dependente**

Conforme relatado na literatura e observado neste trabalho, o ácido jasmônico pode induzir o acúmulo de prolina em condições de estresse hídrico. Este acúmulo pode ocorrer por mecanismos dependentes ou independentes de ABA. Para analisar a dependência de MeJa por ABA no acúmulo de prolina, foi utilizado um mutante deficiente em ABA, o *sitiens*, e foram feitas aplicações exógenas de ABA e MeJa.

Neste experimento, a aplicação exógena de MeJa em *sitiens* não resultou em melhoria do potencial hídrico foliar (Figura 13B) sob estresse osmótico, ao contrário do pequeno, mas significativo aumento que se encontrou em MT + MeJa (Figura 13B). A aplicação exógena de ABA elevou o potencial hídrico foliar a níveis próximos de MT, sob condições de estresse, mas a aplicação de MeJa junto com ABA não causou melhorias adicionais no potencial hídrico foliar. Levando-se em consideração os resultados das Figuras 11B e 13B e baseado na literatura, que indica que o JA pode induzir o fechamento estomático de maneira dependente de ABA (ACHARYA; ASSMANN, 2009), sugere-se que o JA tem um efeito pequeno sobre o potencial hídrico foliar em condições de estresse, mas que o mesmo depende de ABA.

Já o potencial hídrico em *sitiens* sob condições controle, mostrou-se reduzido quando comparado ao MT, independente da aplicação exógena de ABA e MeJa, mostrando que estes hormônios não atuam no aumento do potencial sob condições controle.

Diferentemente do esperado, não houve diferença significativa no CRA em mutantes com aplicação exógena de hormônios, mas estes tiveram o CRA diferente do encontrado em MT. Já em condições controles, somente o CRA de mutantes sob aplicação exógena de MeJa foi reduzido.

Em relação à prolina, conforme esperado, o conteúdo deste aminoácido em mutantes *sitiens* em condições controle foi mais elevado que o MT e que em *sitiens* com aplicação exógena de ABA ou MeJa (Figura 14A). Por ser um mutante com reduzidos níveis de ABA, este mutante parece estar sob constante estresse mesmo sob potenciais hídricos elevados, ocasionado principalmente pela abertura constante dos estômatos, e resultando em um acúmulo moderado, mas significativo de prolina. Por não ter se encontrado diferenças marcantes no perfil da atividade das enzimas do metabolismo de prolina, sugere-se que o acúmulo líquido de prolina em *sitiens* pode ter sido resultante de pequenas diferenças no balanço de síntese e catabolismo. No entanto, a aplicação de ABA recuperou o fenótipo reduzindo os níveis de prolina a valores encontrados em MT em condições controles.



Diferentemente do encontrado em experimentos anteriores, o conteúdo de prolina foi menor em mutantes *sitiens* sob estresse osmótico, quando comparado ao MT nas mesmas condições, diferindo do que havia sido observado até então em tomateiro. Apesar deste resultado, foi observado que tanto ABA quanto MeJa, aplicados isoladamente, aumentaram o acúmulo de prolina, sob estresse osmótico, a níveis semelhante ou até mais altos do que o MT (Figura 14A). No entanto, um acúmulo drástico, superior à soma dos aumentos no acúmulo de prolina induzida pela aplicação de ABA ou MeJa individualmente, foi observado quando os dois hormônios foram aplicados em conjunto. A partir destes resultados, é possível inferir que a prolina em tomateiro Micro-Tom pode ser acumulada por mecanismos em que há algum grau de interdependência entre ABA e MeJa.

A P5CS parece ser controlada por ABA e por MeJa independente de ABA, tanto em condições controles quanto sob estresse osmótico. Intrigantemente, a interação ABA x MeJa pareceu reduzir a atividade de P5CS. Sabe-se que a atividade de P5CS é controlada por mecanismo “feedback” (HONG et al., 2000) e, portanto o elevado conteúdo de prolina observado após 12 h de estresse neste tratamento, provavelmente tenha vindo de uma indução da atividade de P5CS durante o estresse, que pode ter sido reprimida fortemente após o alto acúmulo de prolina e a elevada repressão da P5CDH.

Na ausência de MeJa em níveis elevados, ou seja, em plantas de MT, MT com aplicação exógena de ABA e *sitiens* sob estresse osmótico a prolina parece ser acumulada principalmente pela indução de OAT e não de P5CS. Assim, este resultado sugere mais uma vez que elevados níveis de MeJa superegula a atividade de P5CS, resultando no acúmulo de prolina. Além de apresentar uma maior indução de P5CS sob estresse osmótico, a aplicação de MeJa parece promover uma pequena redução na atividade de OAT. Desta forma, elevadas concentrações de MeJa, na ausência de ABA sob condições de estresse osmótico parece induzir o acúmulo de prolina pela rota principal, em detrimento da rota alternativa.

O MeJa parece reprimir a atividade de P5CR na ausência e presença de ABA, em condições controles e sob estresse hídrico. Por ser uma enzima, na qual o controle de sua atividade depende de uma complexa regulação da transcrição, na qual foi mostrada estar sob regulação osmótica e do desenvolvimento sendo essa enzima considerada como sendo uma etapa não limitante na acumulação de prolina, (VERBRUGGEN et al., 1993), dificuldades são encontradas na interpretação da sua atividade.

Na presença de altas concentrações de MeJa e ABA, há um aumento da atividade de P5CDH em condições controles, onde parece ser inibida fortemente, nas mesmas condições, sugerindo que o controle do acúmulo da prolina sob níveis elevados de MeJa é

provavelmente devido a rota de degradação. Ou seja, sob condições controles a P5CDH é regulada por MeJa dependente de ABA.

## 7. CONCLUSÕES

- A cultivar Micro-Tom (MT) de tomateiro, modelo experimental usado neste trabalho, apresenta boas respostas de acúmulo de prolina induzidas pelo déficit hídrico, sendo este acúmulo bem correlacionado com o status hídrico da folha ( $\Psi_w$  e CRA).
- O uso de mutantes e linhagens transgênicas hormonais introgrididas em MT constitui um sistema e estratégia experimental com bom potencial para o estudo do controle hormonal do acúmulo de prolina e os mecanismos bioquímicos associados a este. Os principais desafios desta abordagem são as dificuldades inerentes associadas com alguns dos mutantes e a dificuldade de se identificar diferenças no acúmulo de prolina que não sejam, na realidade, decorrentes de variações no potencial hídrico foliar. Além disto, ficou evidente que a duração e severidade dos tratamentos são fatores críticos nas respostas diferenciais entre os genótipos.
- A análise de três mutantes deficientes em ABA (*notabilis*, *sitiens* e *flacca*) revelou que, o paradigma atual, de que o acúmulo de prolina é dependente de ABA, não se mostrou ser verdadeiro em tomateiro, corroborando alguns outros poucos relatos na literatura.
- Além dos materiais que foram selecionados para estudos mais detalhados, as linhagens *35S::CKX2* e *35S::nahG* também apresentaram respostas diferenciadas no acúmulo de prolina que merecem ser exploradas.
- Elevados níveis de prosistemina (*35S::PS*) e a aplicação exógena de MeJa em MT parecem atuar em mecanismos de proteção da perda de água, fazendo com que estas plantas mantenham potenciais hídricos mais elevados do que o MT quando submetidas a estresse osmótico. Em *35S::PS*, é provável que este efeito seja, em parte, devido ao aumento nos níveis de JA neste genótipo. Já o efeito de MeJa exógeno na manutenção do  $\Psi_w$  foliar é dependente de ABA.
- Em condições controle (irrigado), elevados níveis de prosistemina (*35S::PS*) e a aplicação exógena de MeJa em MT promovem um aumento do “turnover” da prolina, sem acarretar em alterações no seu conteúdo. Ou seja, tanto a síntese como a degradação da prolina parecem ser aumentadas no controle, principalmente pela indução de P5CS e P5CDH. Com a imposição do estresse osmótico, o maior acúmulo de prolina nestes materiais, em relação ao MT, parece ser principalmente pela inibição mais acentuada da sua degradação. Isto poderá ser melhor concluído com informações sobre a expressão gênica de PDH, cuja atividade não foi determinada por ser de realização mais complexa.

- Em *sitiens*, o aumento do acúmulo de prolina quando este recebeu a aplicação exógena de ABA ou MeJa, sob estresse osmótico, parece ter sido decorrente principalmente de um incremento na atividade de P5CS.
- O aumento no acúmulo de prolina induzida pelo estresse osmótico em *sitiens* + ABA + MeJa, em relação ao *sitiens* sem a aplicação exógena destes hormônios, foi intenso e superior à somatória dos incrementos induzidos pela aplicação individual de cada um, sugerindo algum grau de interdependência entre estes hormônios. Este acúmulo mais intenso de prolina parece ter sido, à semelhança do que foi descrito para 35::PS e MT + MeJa, principalmente pela inibição da degradação de prolina.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHÁM, E.; RIGÓ, G.; SZÉKELY, G.; NAGY, R.; KONCZ, C.; SZABADOS, L. Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 51, n. 3, p. 363–372, 2003.
- ACHARYA, B. R.; ASSMANN, S. M. Hormone interactions in stomatal function. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht v. 69, n. 4, p. 451–462, 2009.
- ALONSO, R.; ELVIRA, S.; CASTILLO, F. J.; GIMENO, B. S. Interactive effects of ozone and drought stress on pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halepensis*. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, n. 9, p. 905–916, 2001.
- ALVAREZ, I.; TOMARO, M.L.; BENAVIDES, M.P. Changes in polyamines, proline and ethylene in sunflower calluses treated with NaCl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, n. 1, p. 51–59, 2003.
- ANJUM, S. A.; WANG, L.; FAROOQ, M.; KHAN, I.; XUE, L. Methyl jasmonate-induced alteration in lipid peroxidation, antioxidative defence system and yield in soybean under drought. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, v. 197, n. 4, p. 296-301, 2011.
- ARNON, D. I.; HOAGLAND, D. R. Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients. **Soil Science**, Philadelphia, v. 50, n. 1, p. 463–485, 1940.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 601–639, 1999.
- AYLIFFE, M. A.; ROBERTS, J. K.; MITCHELL, H. J.; ZHANG, R.; LAWRENCE, G. J.; ELLIS, J. G.; PRYOR, T. J. A plant gene up-regulated at rust infection sites. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n. 1, p. 169–180, 2002.
- BARI, R.; JONES, J. D. G. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 473–488, 2009.
- BARTELS, D.; SOUR, E. Molecular responses of higher plants to dehydration. In: HERIBERT, H.; SHINOZAKI, K. (Eds.). **Plant responses to abiotic stress**. Berlin: Springer, 2004. chap. 2, p. 13–37.
- BASSEL, G. W.; MULLEN, R. T.; BEWLEY, J. D. *procera* is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 585–593, 2008.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 39, n. 1, p. 205–207, 1973.

- BEHNAMNIA, M.; KALANTARI, K. M.; ZIAIE, J. The effects of brassinosteroid on the induction of biochemical changes in *Lycopersicon esculentum* under drought stress. **Turkish Journal of Botany**, Ankara, v. 33, n. 6, p. 417–428, 2009.
- BEERLING, D.J.; ROYER, D.L. Convergent Cenozoic CO<sub>2</sub> history. **Nature Geoscience**, London, v. 4, p. 418–420, 2011.
- BISHOP, G. J.; HARRISON, K.; JONES, J. D. G. The tomato Dwarf gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 6, p. 959–969, 1996.
- BOHNERT, H. J.; SHEN, B. Transformation and compatible solutes. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 78, n. 1-4, p. 237–260, 1999.
- BOHNERT, H. J.; SU, H.; SHEN, B. Molecular mechanisms of salinity tolerance. In: SHINOZAKI, K. (Ed.). **Cold, drought, heat, and salt stress: molecular responses in higher plants**. Austin: R. G. Landes, 1999. chap. 3, p. 29–60.
- BOSTOCK, R. M. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the line between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, n. 1, p. 545–580, 2005.
- BOYER, J. S. Plant productivity and environment. **Science**, Washington, v. 218, n. 4571, p. 443–448, 1982.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRADING, P. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; PARR, A.; JONES, J. D. G. Salicylic acid is not required for Cf-2- and Cf-9-dependent resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 305–318, 2000.
- BURBIDGE, A.; GRIEVE, T. M.; JACKSON, A.; THOMPSON, A.; MCCARTY, D. R.; TAYLOR, I. B. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize *Vp14*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 427–431, 1999.
- CAO, S.; CAI, Y.; YANG, Z.; ZHENG, Y. MeJa induces chilling tolerance in loquat fruit by regulating proline and  $\alpha$ -aminobutyric acid contents. **Food Chemistry**, Oxford, v. 133, n.4, p. 1466–1470, 2012.
- CARPITA, N.; SABULARSE, D.; MONTEZINOS, D.; DELMER, D. P. Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. **Science**, Washington, v. 205, n. 4411, p. 1144–1147, 1979.
- CARVALHO, R. F.; AIDAR, S. T.; AZEVEDO, R.A.; DODD, I.C.; PERES, L.E.P. Enhanced transpiration rate in the *high pigment 1* tomato mutant and its physiological significance. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 13, p. 546–550, 2011.

CARVALHO, R. F.; CAMPOS, M. L.; PINO, L. E.; CRESTANA, S. L.; ZSÖGÖN, A.; LIMA, J. E.; BENEDITO, V. A.; PERES, L. E. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: “Micro-Tom” as an effective toolkit for plant development research. **Plant Methods**, London, v. 7, n. 1, p. 18, 2011.

CATTIVELLI, L.; RIZZA, F.; BADECK, F.-W.; MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A. M.; FRANZIA, E.; MARÈ, C.; TONDELLI, A.; STANCA, A. M. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 105, n. 1-2, p. 1–14, 2008.

CHAITANYA, K. V.; JUTUR, P. P.; SUNDAR, D.; REDDY, A. R. Water stress effects on photosynthesis in different mulberry cultivars. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 40, n. 1, p. 75–80, 2003.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 30, n. 3, p. 239–264, 2003.

CHAVES, M. M.; OLIVEIRA, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 407, p.2365-2384, 2004.

CHEN, C. T.; CHEN, L. M.; LIN, C. C.; KAO, C. H. Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. **Plant Science**, Shannon, v. 160, p. 283–290, 2001.

CHEN, C.T.; KAO, C.H. Osmotic stress and water stress have opposite effects on putrescine and proline production in excised rice leaves. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 13, n. 2, p.197-202, 1993.

CHIANG, H.-H.; DANDEKAR, A. M. Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh during development and in response to desiccation. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 18, n. 11, p. 1280–1290, 1995.

CLOUSE, S. D.; LANGFORD, M.; MCMORRIS, T. C. A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, n. 3, p. 671–678, 1996.

CSONKA, L. N.; HANSON, A. D. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 45, n. 1, p. 569–606, 1991.

DAN, Y.; YAN, H.; MUNYIKWA, T.; DONG, J.; ZHANG, Y.; ARMSTRONG, C. L. MicroTom - a high-throughput model transformation system for functional genomics. **Plant Cell Reports**, New York, v. 25, n. 5, p. 432–441, 2006.

DAVIES, P.J. The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: DAVIES, P.J. **Plant hormones physiology, biochemistry and molecular biology**. 2. ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. chap. 1, p. 1–12.

DE CAMPOS, M. K. F.; DE CARVALHO, K.; DE SOUZA, F. S.; MARUR, C. J.; PEREIRA, L. F. P.; FILHO, J. C. B.; VIEIRA, L. G. E. Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic 'Swingle' citrumelo plants over-accumulating proline. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 242-250, 2011.

DELAUNEY, A. J.; HU, C. A.; KISHOR, P. B.; VERMA, D. P. Cloning of ornithine  $\delta$ -aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by *trans*-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 268, n. 25, p. 18673–18678, 1993.

DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 4, p. 215–223, 1993.

DEUSCHLE, K. The role of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 12, p. 3413–3425, 2004.

DEUSCHLE, K.; FUNCK, D.; HELLMANN, H.; DÄSCHNER, K.; BINDER, S.; FROMMER, W. B. A nuclear gene encoding mitochondrial  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. **The Plant Journal**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 345–356, 2001.

DIAMANT, S.; ELIAHU, N.; ROSENTHAL, D.; GOLOUBINOFF, P. Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 43, p. 39586–39591, 2001.

DOMBROWSKI, J. E. Salt stress activation of wound-related genes in tomato plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 4, p. 2098–2107, 2003.

ECKER, J. R. The ethylene signal transduction pathway in plants. **Science**, Washington, v. 268, n. 5211, p. 667–675, 1995.

EMMANUEL, E.; LEVY, A. A. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 2, p. 112–117, 2002.

ESTELLE, M.; KLEE, H. Auxin and cytokinin. In: MEYEROWITZ, E.; SOMERVILLE, C. (Eds.). **The Arabidopsis book**. 27. ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. chap. 21, p. 555-578.

FABRO, G.; KOVÁCS, I.; PAVET, V.; SZABADOS, L.; ALVAREZ, M. E. Proline accumulation and *AtP5CS2* gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 17, n. 4, p. 343–350, 2004.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; BASRA, S. M. A.; ISLAM-UD-DIN. Improving water relations and gas exchange with brassinosteroids in rice under drought stress. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, v. 195, n. 4, p. 262–269, 2009.

FERREIRA-SILVA, S.L. **Mecanismos de proteção oxidativa contra estresses isolados e combinados de seca, salinidade e temperatura elevada em cajueiro**. 2008. 162 f. Tese



(Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

FIDALGO, F.; SANTOS, A.; SANTOS, I.; SALEMA, R. Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. **Annals of Applied Biology**, Hoboken, v. 145, n. 2, p. 185–192, 2004.

FINKELSTEIN, R.R.; ZEEVART, J.A.D. Gibberellin and abscisic acid biosynthesis and response. In: MEYEROWITZ, E.; SOMERVILLE, C.; (Eds). **The Arabidopsis book**. 27. ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. chap 20, p. 523-554.

FUJITA, T.; MAGGIO, A.; GARCIA-RIOS, M.; BRESSAN, R. A.; CSONKA, L. N. Comparative analysis of the regulation of expression and structures of two evolutionarily divergent genes for  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase from tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 2, p. 661–674, 1998.

GARCÍA-RÍOS, M.; FUJITA, T.; LAROSA, P. C.; LOCY, R. D.; CLITHERO, J. M.; BRESSAN, R. A.; CSONKA, L. N. Cloning of a polycistronic cDNA from tomato encoding  $\gamma$ -glutamyl kinase and  $\gamma$ -glutamyl phosphate reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 94, n. 15, p. 8249–8254, 1997.

GOMES, F. P.; OLIVA, M. A.; MIELKE, M. S.; ALMEIDA, A.-A. F.; AQUINO, L. A. Osmotic adjustment, proline accumulation and cell membrane stability in leaves of *Cocos nucifera* submitted to drought stress. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 126, n. 3, p. 379–384, 2010.

HAMILTON, E. W.; HECKATHORN, S. A. Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, n. 3, p. 1266–1274, 2001.

HANDA, S.; HANDA, A. K.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. **Plant Physiology**, Rockville, v. 80, n. 4, p. 938–945, 1986.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 535–553, 1998.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; STADEN, J. VAN. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 333, p. 413–434, 1999.

HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J.-K.; BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, n. 1, p. 463–499, 2000.

HELLMANN, H.; FUNCK, D.; RENTSCH, D.; FROMMER, W. B. Hypersensitivity of an *Arabidopsis* sugar signaling mutant toward exogenous proline application. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 2, p. 357–368, 2000.

HILLE, J.; KOORNNEEF, M.; RAMANNA, M.; ZABEL, P. Tomato - a crop species amenable to improvement by cellular and molecular methods. **Euphytica**, Dordrecht, v. 42, n. 1-2, p. 1–23, 1989.

HONG-QI, Z.; CROES, A. F. Protection of pollen germination from adverse temperatures: a possible role for proline. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 6, n. 6, p. 471–476, 1983.

HONG, Z. L.; LAKKINENI, K.; ZHANG, Z. M.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 4, p. 1129–1136, 2000.

HOSSAIN, M. A.; MUNEMASA, S.; URAJI, M.; NAKAMURA, Y.; MORI, I. C.; MURATA, Y. Involvement of endogenous abscisic acid in methyl jasmonate-induced stomatal closure in arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 156, n. 1, p. 430–438, 2011.

HU, C. A.; DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. A bifunctional enzyme ( $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 89, n. 19, p. 9354–9358, 1992.

JOHNSON, S. M.; DOHERTY, S. J.; CROY, R. R. D. Biphasic superoxide generation in potato tubers. A self-amplifying response to stress. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, n. 3, p. 1440–1449, 2003.

KIM, H. R.; RHO, H. W.; PARK, J. W.; PARK, B. H.; KIM, J. S.; LEE, M. W. Assay of ornithine aminotransferase with ninhydrin. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 223, n. 2, p. 205–207, 1994.

KISHOR, P. B. K. Effect of salt stress on callus cultures of *Oryza sativa* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 235–240, 1988.

KIYOSUE, T.; YOSHIBA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 8, p. 1323–1335, 1996.

KOKA, C. V.; CERNY, R. E.; GARDNER, R. G.; NOGUCHI, T.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; YOSHIDA, S.; CLOUSE, S. D. A putative role for the tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 1, p. 85–98, 2000.

KOLTAI, H.; LEKKALA, S. P.; BHATTACHARYA, C.; MAYZLISH-GATI, E.; RESNICK, N.; WININGER, S.; DOR, E.; YONEYAMA, K.; YONEYAMA, K.; HERSHENHORN, J.; JOEL, D. M.; KAPULNIK, Y. A tomato strigolactone-impaired mutant displays aberrant shoot morphology and plant interactions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 6, p. 1739–1749, 2010.

LABORATÓRIO DE CONTROLE HORMONAL E DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS. Disponível em: < <http://www.esalq.usp.br/tomato/>>. Acesso em: 10 janeiro 2014.

LAFITTE, R. Relationship between leaf relative water content during reproductive stage water deficit and grain formation in rice. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.76, p.165-174, 2002.

LAWLOR, D. W. Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 83–108, 2013.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 275–294, 2002.

LEE, G. J.; ROSEMAN, A. M.; SAIBIL, H. R.; VIERLING, E. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 659–671, 1997.

LEVITT, J. Responses of plants to environmental stresses. In: YOUNGNER, V. B.; MCKELL, C. M. (Eds.). **Water, radiation, salt and other stresses**. 2. ed. New York: Academic Press, 1980. chap.1, p.93-128.

LI, C.; LIU, G.; XU, C.; LEE, G.I.; BAUER, P.; LING, H. Q.; GANAL, M.W.; HOWE, G.A. The tomato *Suppressor of prosystemin-mediated responses2* gene encodes a fatty acid desaturase required for the biosynthesis of jasmonic acid and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. **The Plant Cell**, v. 15, n. 7, p. 1646–1661, 2003.

LIU, J.; ZHU, J. K. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, n. 2, p. 591–596, 1997.

LUDLOW, M.M. Strategies of response to water stress. In: KREEB, K.H.; RICHTER, H.; HINCKLEY, T.M. (Eds.). **Structural and functional responses to environmental stresses**. The Hague: SBP Academic Publishing, 1989. p. 269-281.

LUTTS, S.; MAJERUS, V.; KINET, J.-M. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, n. 3, p. 450–458, 1999.

MANI, S.; COTTE, B. V. DE; MONTAGU, M. V.; VERBRUGGEN, N. Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 128, n. 1, p. 73–83, 2002.

MARIN, E.; MARIONPOLL, A. Tomato flacca mutant is impaired in ABA aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase activities. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 35, n. 5, p. 369–372, 1997.

MAUCH-MANI, B.; MAUCH, F. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, n. 4, p. 409–414, 2005.

MCGURL, B.; OROZCO-CARDENAS, M.; PEARCE, G.; RYAN, C. A. Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 91, n. 21, p. 9799–9802, 1994.

MCNEIL, S. D.; NUCCIO, M. L.; HANSON, A. D. Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, n. 4, p. 945–949, 1999.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 1465–1472, 1997.

MICHEL, B.E.; KAUFMANN, M.R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. **Plant Physiology**, Rockville, v. 51, n. 5, p. 914-916, 1973.

MILLER, G.; HONIG, A.; STEIN, H.; SUZUKI, N.; MITTLER, R.; ZILBERSTEIN, A. Unraveling  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 284, n. 39, p. 26482–26492, 2009.

MORGAN, J. M. Osmoregulation and water stress in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 35, n. 1, p. 299–319, 1984.

MORGAN, P. W.; DREW, M. C. Ethylene and plant responses to stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, n. 3, p. 620–630, 1997.

MUELLER, L. A.; LANKHORST, R. K.; TANKSLEY, S. D.; et al. A snapshot of the emerging tomato genome sequence. **Plant Genome**, Madison, v. 2, n. 1, p. 78–92, 2009.

MUNEMASA, S.; ODA, K.; WATANABE-SUGIMOTO, M.; NAKAMURA, Y.; SHIMOISHI, Y.; MURATA, Y. The *coronatine-insensitive 1* mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in arabidopsis guard cells. specific impairment of ion channel activation and second messenger production. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, n. 3, p. 1398–1407, 2007.

MUNNS, R. Why measure osmotic adjustment? **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 15, n. 6, p. 717–726, 1988.

NAMBARA, E.; KAWAIDE, H.; KAMIYA, Y.; NAITO, S. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant that has a defect in ABA accumulation: ABA-dependent and ABA-independent accumulation of free amino acids during dehydration. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 39, n. 8, p. 853–58, 1998.

OERTLI, J. The response of plant-cells to different forms of moisture stress. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 121, n. 4, p. 295–300, 1985.

OH, K.; IVANCHENKO, M. G.; WHITE, T. J.; LOMAX, T. L. The *diageotropica* gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. **Planta**, Berlin, v. 224, n. 1, p. 133–144, 2006.

ORSINI, F.; CASCONI, P.; DE PASCALE, S.; BARBIERI, G.; CORRADO, G.; RAO, R.; MAGGIO, A. Systemin-dependent salinity tolerance in tomato: evidence of specific convergence of abiotic and biotic stress responses. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 138, n. 1, p. 10–21, 2010.

PARRE, E.; VIRVILLE, J.; COCHET, F.; LEPRINCE, A. S.; RICHARD, L.; LEFEBVRE-DEVOS, D.; GHARS, M. A.; BORDENAVE, M.; ZACHOWSKI, A.; SAVOURÉ, A. A New Method for Accurately Measuring  $\Delta^1$ -Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Activity. In: RAMANJULU, S. New York: **Plant stress tolerance: methods in molecular biology**, 2010. cap. 21, p.333–340.

PELTZER, D.; DREYER, E.; POLLE, A. Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species: *Fagus sylvatica* and *Coleus blumei*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, n. 2, p. 141–150, 2002.

PERASSOLO, M.; QUEVEDO, C. V.; BUSTO, V. D.; GIULIETTI, A. M.; TALOU, J. R. Role of reactive oxygen species and proline cycle in anthraquinone accumulation in *Rubia tinctorum* cell suspension cultures subjected to methyl jasmonate elicitation. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 49, n. 7, p.758-763, 2011.

QIU, D.; DIRETTO, G.; TAVARZA, R.; GIULIANO, G. Improved protocol for Agrobacterium mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene *CsZCD*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 112, n. 2, p. 172–175, 2007.

RADYUKINA, N. L.; SHASHUKOVA, A. V.; SHEVYAKOVA, N. I.; KUZNETSOV, V. V. Proline involvement in the common sage antioxidant system in the presence of NaCl and paraquat. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 55, n. 5, p. 649–656, 2008.

REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, n. 11, p. 1189–1202, 2004.

RIBARITS, A.; ABDULLAEV, A.; TASHPULATOV, A.; RICHTER, A.; HEBERLE-BORS, E.; TOURAEV, A. Two tobacco proline dehydrogenases are differentially regulated and play a role in early plant development. **Planta**, Berlin, v. 225, n. 5, p. 1313–1324, 2007.

RICK, C. M.; YODER, J. I. Classical and molecular genetics of tomato: highlights and perspectives. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, n. 1, p. 281–300, 1988.

ROBERT-SEILANIANTZ, A.; GRANT, M.; JONES, J. D. G. Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, n. 1, p. 317–343, 2011.

DA ROCHA, I. M. A.; VITORELLO, V. A.; SILVA, J. S.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIÉGAS, R. A.; SILVA, E. N.; SILVEIRA, J. A. G. Exogenous ornithine is an effective precursor and the  $\delta$ -ornithine amino transferase pathway contributes to proline accumulation under high N recycling in salt-stressed cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 169, n. 1, p. 41–49, 2012.

ROOSENS, N. H. C. J.; THU, T. T.; ISKANDAR, H. M.; JACOBS, M. Isolation of the ornithine- $\delta$ -aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, n. 1, p. 263–271, 1998.

SAUTER, A.; HARTUNG, W. Radial transport of abscisic acid conjugates in maize roots: its implication for long distance stress signals. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 346, p. 929–935, 2000.

SAVOURÉ, A.; JAOUA, S.; HUA, X.-J.; ARDILES, W.; VAN MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 372, n. 1, p. 13–19, 1995.

SCHROEDER, J. I.; KWAK, J. M.; ALLEN, G. J. Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. **Nature**, London, v. 410, n. 6826, p. 327–330, 2001.

SCOTT, J.W.; HARBAUGH, B.K. **Micro-Tom**: a miniature dwarf tomato. Gainesville: Agricultural Experimental Station, 1989. 6 p. (Agricultural Experimental Station Circular).

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T.R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 333–341, 2002.

SERRANO, R.; MULET, J. M.; RIOS, G.; MARQUEZ, J. A.; LARRINOA, I. I. F. D.; LEUBE, M. P.; MENDIZABAL, I.; PASCUAL-AHUIR, A.; PROFT, M.; ROS, R.; MONTESINOS, C. A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. Special, p. 1023–1036, 1999.

SHAKIROVA, F. M.; SAKHABUTDINOVA, A. R.; BEZRUKOVA, M. V.; FATKHUTDINOVA, R. A.; FATKHUTDINOVA, D. R. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. **Plant Science**, Shannon, v. 164, n. 3, p. 317–322, 2003.

SHANAHAN, J.F.; EDWARDS, I.B.; QUICK, J.S.; FENWICK, J.R. Membrane thermostability and heat tolerance of spring wheat. **Crop Science**, Madison, v. 30, n. 2, p. 247–251, 1990.

SHARMA, S.; VERSLUES, P. E. Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 33, n. 11, p. 1838–1851, 2010.

SHARMA, S.; VILLAMOR, J. G.; VERSLUES, P. E. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. **Plant Physiology**, Rockville, v. 157, n. 1, p. 292–304, 2011.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, Rockville, v. 115, n. 2, p. 327–334, 1997.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought stress. In: \_\_\_\_\_ (Eds.). **Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants**. Austin: R.G. Landes, 1999. chap. 10, p.11-28.

SILVA, F. A.; AZEVEDO, C. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71–78, 2002.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 1057–1060, 1989.

SPOKAS, E. G.; SPUR, B. W. Rapid measurement of low levels of sodium, potassium-ATPase activity by ascorbic acid reduction without strong acid. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 299, n. 1, p. 112–116, 2001.

STEWART, C. R.; VOETBERG, G. Abscisic acid accumulation is not required for proline accumulation in wilted leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 83, n. 4, p. 747–749, 1987.

STEWART, C. R.; VOETBERG, G.; RAYAPATI, P. J. The effects of benzyladenine, cycloheximide, and cordycepin on wilting-induced abscisic acid and proline accumulations and abscisic acid-and salt-induced proline accumulation in barley leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 82, n. 3, p. 703–707, 1986.

STRIZHOV, N.; ÁBRAHÁM, E.; ÖKRÉSZ, L.; BLICKLING, S.; ZILBERSTEIN, A.; SCHELL, J.; KONCZ, C.; SZABADOS, L. Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by *ABAI*, *ABII* and *AXR2* in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 557–569, 1997.

SU, M.; LI, X.-F.; MA, X.-Y.; PENG, X.-J.; ZHAO, A.-G.; CHENG, L.-Q.; CHEN, S.-Y.; LIU, G.-S. Cloning two *P5CS* genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment. **Plant Science**, Shannon, v. 181, n. 6, p. 652–659, 2011.

SUHITA, D. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, n. 4, p. 1536–1545, 2004.

SUN, H.-J.; UCHII, S.; WATANABE, S.; EZURA, H. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 426–431, 2006.

SUN, J.-Q.; JIANG, H.-L.; LI, C.-Y. Systemin/jasmonate-mediated systemic defense signaling in tomato. **Molecular Plant**, Oxford, v. 4, n. 4, p. 607–615, 2011.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 15, n. 2, p. 89–97, 2010.

TANKSLEY, S. D. The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. S181–S189, 2004.

TARDIEU, F.; DAVIES, W. J. Stomatal response to abscisic acid is a function of current plant water status. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, n. 2, p. 540–545, 1992.

TAYLOR, I. B.; LINFORTH, R. S. T.; AL-NAIEB, R. J.; BOWMAN, W. R.; MARPLES, B. A. The wilted tomato mutants *flacca* and *sitiens* are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 11, n. 8, p. 739–745, 1988.

THOMAS, J. C.; MCELWAIN, E. F.; BOHNERT, H. J. Convergent induction of osmotic stress-responses abscisic acid, cytokinin, and the effects of NaCl. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, n. 1, p. 416–423, 1992.

ULMASOV, T.; MURFETT, J.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. J. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 11, p. 1963–1971, 1997.

UMEBESE. Salicylic acid protects nitrate reductase activity, growth and proline in amaranth and tomato plants during water deficit. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, New York, v. 4, n. 3, p. 224–229, 2009.

VAN DER WEELE, C. M.; SPOLLEN, W. G.; SHARP, R. E.; BASKIN, T. I. Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 350, p. 1555–1562, 2000.

VENDRUSCOLO, E. C. G.; SCHUSTER, I.; PILEGGI, M.; SCAPIM, C. A.; MARUR, C. J.; VIEIRA, L. G. E. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, n. 10, p. 1367–1376, 2007.

VERBRUGGEN, N.; HUA, X. J.; MAY, M.; MONTAGU, M. V. Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 93, n. 16, p. 8787–8791, 1996.

VERBRUGGEN, N.; VILLARROEL, R.; MONTAGU, M. V. Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, n. 3, p. 771–781, 1993.

VERSLUES, P. E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J.-K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, Oxford, v. 45, n. 4, p. 523–539, 2006.

VERSLUES, P. E.; BRAY, E. A. LWR1 and LWR2 are required for osmoregulation and osmotic adjustment in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n. 1, p. 2831–2842, 2004.

VERSLUES, P. E.; BRAY, E. A. Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 201–212, 2006.



VERSLUES, P.E.; SHARMA, S. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. In: SOMERVILLE, C.R.; MEYEROWITZ, E.M. (Eds.). 8. ed. Rockville: **The Arabidopsis book**, 2010. chap. 1, p.1-23.

WALIA, H.; WILSON, C.; CONDAMINE, P.; LIU, X.; ISMAIL, A. M.; CLOSE, T. J. Large-scale expression profiling and physiological characterization of jasmonic acid-mediated adaptation of barley to salinity stress. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 410–421, 2007.

WAMPLE, R. L.; BEWLEY, J. D. Proline accumulation in flooded and wilted sunflower and the effects of benzyladenine and abscisic acid. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 53, n. 23, p. 2893–2896, 1975.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.; SCHMULLING, T. Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 11, p. 2532–2550, 2003.

WILKINSON, J. Q.; LANAHAN, M. B.; YEN, H.-C.; GIOVANNONI, J. J.; KLEE, H. J. An Ethylene-inducible component of signal transduction encoded by never-ripe. **Science**, Washington, v. 270, n. 5243, p. 1807–1809, 1995.

WILKINSON, S.; DAVIES, W. J. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 195–210, 2002.

WILLIAMS, I.; FRANK, L. Improved chemical synthesis and enzymatic assay of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylic acid. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 64, n. 1, p. 85–97, 1975.

WYN JONES, R.G.; GORHAM, J. Osmoregulation. In: LANGE, O.L. (Ed.). **Encyclopedia of Plant Physiology**. Berlin: Springer-Verlag, 1983. p. 35–58.

XIN, Z.; BROWSE, J. *eskimo1* mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 95, n. 13, p. 7799–7804, 1998.

YANCEY, P.H. Compatible and counteracting solutes. In: STRANGE, K. (Ed.) **Cellular and molecular physiology of cell volume regulation**. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1994. p. 81–109.

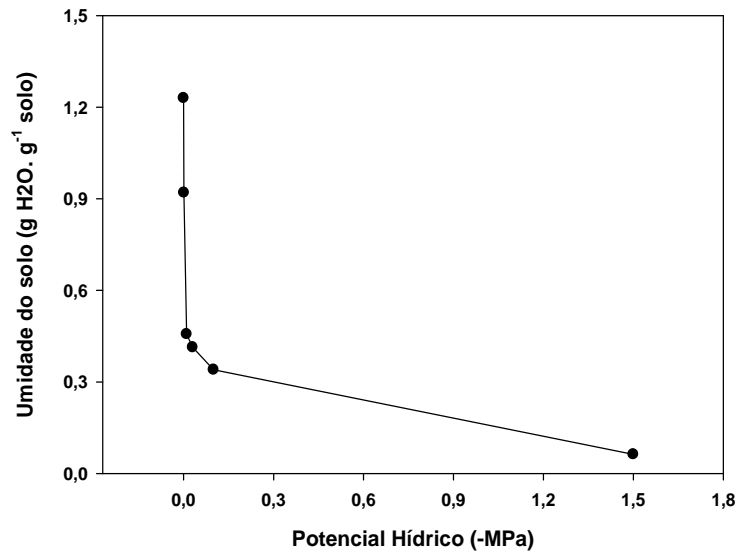
YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 10, n. 2, p. 88–94, 2005.

YOSHIBA, Y.; KIYOSUE, T.; KATAGIRI, T.; UEDA, H.; MIZOGUCHI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; WADA, K.; HARADA, Y.; SHINOZAKI, K. Correlation between the induction of a gene for  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. **The Plant Journal**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 751–760, 1995.

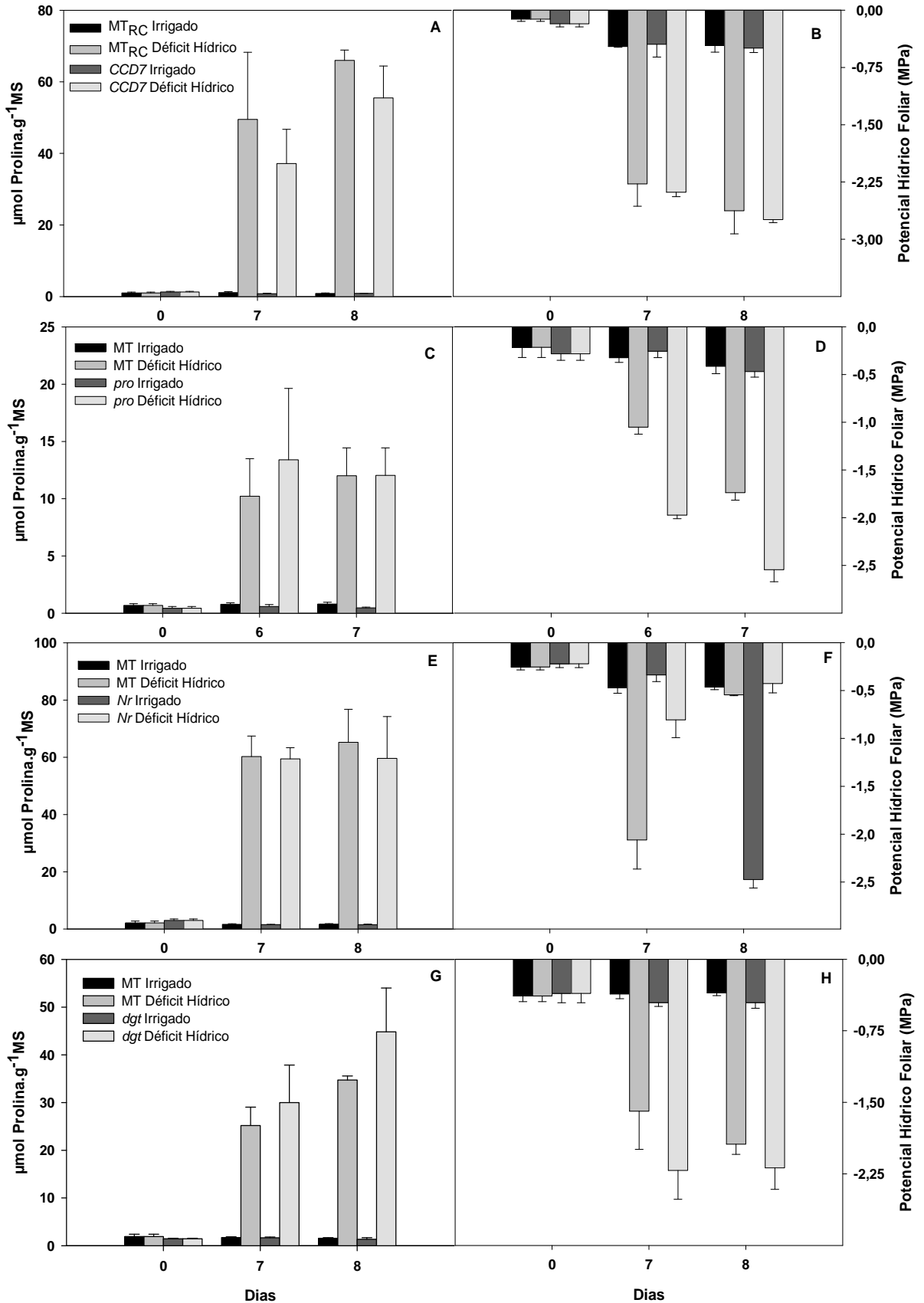
ZHU, J.-K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, n. 2, p. 66–71, 2001.

ZHU, J.-K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p. 247–273, 2002.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A** - Curva de retenção de água do substrato utilizado nos experimentos de déficit hídrico

**APÊNDICE B** - Acúmulo diferencial de prolina em genótipos da cultivar Micro-Tom. Conteúdo de prolina e potencial hídrico foliar em *35S::asCCD7*(A e B), *procera* (C e D), *Never ripe* (E e F) e *dgt* (G e H), submetidos ao déficit hídrico por suspensão de rega por tempos variáveis. Barras representam o desvio padrão (n=3)



**APÊNDICE C** - Acúmulo de prolina em genótipos de Micro-Tom em resposta a reduzidos potenciais hídricos. Conteúdo de prolina e potencial hídrico foliar em MT e MT<sub>RC</sub> (A e B) submetidos a -1,2 MPa e conteúdo de prolina e potencial hídrico foliar em MT e MT<sub>RC</sub> (C e D) submetidos a -0,8 MPa durante 36 h. Barras representam o desvio padrão (n=3)

