



TOLERÂNCIA À SECA EM PLANTAS

Mecanismos fisiológicos e moleculares

Estresses abióticos, como a seca, podem reduzir significativamente os rendimentos das lavouras e restringir as latitudes e os solos onde espécies comercialmente importantes podem ser cultivadas. As implicações são enormes, uma vez que não somente produtores mas toda a sociedade é afetada. Desemprego, aumento no preço de alimentos e instabilidade no mercado financeiro são somente algumas das conseqüências. Previsões ambientais sinalizam para o aumento do aquecimento global nas próximas décadas. Um aumento dos períodos de seca certamente acompanharão esse fenômeno. O desenvolvimento de cultivares mais tolerantes a períodos de déficit hídrico, bem como o desenvolvimento de tecnologias que auxiliem as plantas a tolerar períodos prolongados de estiagem, serão essenciais na manutenção da produção agrícola brasileira e mundial em níveis que possam alimentar uma população em constante crescimento.

A fisiologia das plantas e a biologia molecular desempenharão um papel chave nesse processo. Portanto, entender a tolerância das plantas à seca e como explorá-las, devem ser julgados não só como problemas de ordem agrônômica, fisiológica ou ecológica, mas também como importante meta internacional de significância humanitária, econômica e política (van Rensburg, 1994).

A identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca são fundamentais no desenvolvimento de novas cultivares comerciais mais tolerantes ao déficit hídrico. A expressão de genes (ainda não caracterizados) em genótipos tolerantes a esse fator pode ser usada no estudo de mecanismos de tolerância à seca e para identificar outros genótipos com características similares. Tolerância das plantas à seca, claramente, não é uma caracterís-

tica simples, mas uma característica onde mecanismos trabalham isoladamente ou em conjunto para evitar ou tolerar períodos de déficit hídrico. Todas as mudanças fisiológicas, morfológicas e de desenvolvimento em plantas têm uma base molecular/genética. Portanto, genótipos que diferem em tolerância ao déficit hídrico devem apresentar diferenças qualitativas e quantitativas em expressão gênica. Uma resposta fisiológica específica ao déficit hídrico representa, na realidade, a combinação de eventos moleculares prévios, que foram ativados pela percepção do sinal de estresse. Compreender como esses eventos são ativados/desativados e como interagem entre si será essencial no desenvolvimento de novas variedades mais tolerantes a períodos de seca.

Evolução: da água para a terra

No início da sua evolução, há cerca de 1,5 bilhão de anos (Lehninger et al., 1993), as plantas passaram por inúmeras mudanças na sua estrutura e no processo fisiológico, que as capacitaram para sobreviver em ambientes relativamente secos. Essas mudanças resultaram de mutações genéticas e recombinações, que, através da seleção natural, permitiram às plantas sobreviverem e a se reproduzirem em ambientes com limitação de água. Evidências baseadas em microfósseis mostram que plantas adaptadas à terra originaram-se no início da era Paleozóica, possivelmente cerca de 450 a 470 milhões de anos (Pearson, 1995). É interessante mencionar que, das primeiras plantas terrestres às primeiras plantas com flores, transcorreram mais de 450 milhões de anos (Ingrouille, 1992). Isso é um exemplo dos imensos intervalos de tempo que separam os grandes passos de diferenciação. Esses intervalos possibilitaram a atuação conjunta das mutações genômicas e da seleção natural na constru-

Alexandre Lima Nepomuceno

Pesquisador da Embrapa Soja
Ph.D. pela University of Arkansas
em Biologia Molecular e Fisiologia
Vegetal
anepo@cnpso.embrapa.br

Norman Neumaier

Pesquisador da Embrapa Soja
Ph.D., pela University of Missouri em
Fisiologia Vegetal

José Renato Bouças Farias

Pesquisador da Embrapa Soja
Doutorado Pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul em
Agrometeorologia

Tetsuji Oya

Pesquisador do Jircas (Japan
International Research Center for
Agricultural Sciences)
Doutorado pela University of Tokyo
em Agronomy

ção da atual diversidade da flora.

Modificações drásticas no clima da terra dirigiram a seleção de plantas para uma maior tolerância à deficiência hídrica. Com o clima da terra tornando-se mais severo à medida que os continentes se moviam e que grandes massas de terra se tornavam expostas, desenvolveram-se adaptações estruturais e funcionais entre as plantas. Essas adaptações incluíram raízes, que permitiam a absorção de água e de minerais a partir de grandes volumes de solo; um sistema vascular, que permitia um rápido transporte da água e de produtos da fotossíntese; e uma cutícula bem desenvolvida, com estômatos, que permitia a entrada de dióxido de carbono, mas controlava a perda de água dos tecidos (Kramer e Boyer, 1995). O desenvolvimento de folhas, raízes e de outras estruturas adaptadas ajudou a aumentar a diversidade florística em diferentes ambientes terrestres. Plantas que mostram crescimento continuado ou melhorado sob condições hídricas limitadas são consideradas tolerantes à seca. Algumas espécies podem evitar a seca amadurecendo rapidamente antes que ela se inicie ou reproduzindo-se somente após a chuva (Alvim, 1985). Outras plantas toleram a desidratação, adiando-a através do desenvolvimento de raízes profundas ou fechando-se fortemente contra a transpiração ou acumulando grandes reservas de água em tecidos carnosos (Ingrouille, 1992). Ainda, outras espécies permitem a desidratação dos tecidos e toleram a falta de água, apresentando crescimento continuado mesmo quando desidratadas ou sobrevivendo a desidratações severas.

Durante períodos de déficit hídrico, muitas mudanças ocorrem na planta. Essas mudanças dependem da severidade e da duração do estresse, do genótipo, do estágio de desenvolvimento e da natureza do estresse (Kramer, 1983). A maioria dessas modificações visa a manter o crescimento e a reprodução da planta em ambientes com limitações na disponibilidade de água.

Melhoramento Genético

Do ponto de vista prático é muito difícil a imposição de estresse de seca, de forma controlada e reproduzível, às grandes populações de plantas normalmente usadas em programas de melhoramento. Monitoramentos abrangentes



Figura 1. A perda de água pela célula altera o potencial de pressão (tensão física; turgor) e o potencial osmótico (concentração) dessas células. Isso provoca alterações na membrana celular e em vários de seus componentes assim como na concentração celular de metabólitos. Alterações na conformação da membrana celular provocam mudanças em canais de transporte ativados por pressão, modificam a conformação ou a justaposição de proteínas sensoriais críticas embebidas nas membranas celulares, e alteram a continuidade entre a parede celular e membrana celular. Estas modificações ativam complexos enzimáticos, que iniciam uma cascata de eventos moleculares que levam à indução da expressão de várias categorias de genes

do crescimento e de parâmetros fisiológicos raramente têm sido usados para selecionar plantas mais produtivas em ambientes com déficit hídrico (Basnayake et al., 1995). Melhoristas de plantas têm tentado selecionar plantas com tolerância à seca a partir de grandes populações, entretanto, altos rendimentos e resistência a doenças têm sido os alvos finais das análises. Esse enfoque experimental na seleção de plantas para tolerância ao estresse hídrico tem sido o método escolhido na quase totalidade dos casos (Simpson, 1981). A maioria dos enfoques, meramente identifica plantas com altos ou baixos rendimentos, porque o critério final de seleção é um simples índice, tal como rendimento de grãos ou produção de biomassa na época da colheita.

Tais enfoques geralmente têm falhado em revelar as características genéticas individuais que afetam a tolerância à seca e que poderiam ser seletivamente orientadas para recombinação adicional. Características genômicas de uma planta que apresenta, por exemplo, tolerância ao estresse de seca na

antesse, ou escape ao estresse de seca no enchimento dos grãos, combinado com tolerância a períodos curtos de estresse de pequena magnitude, podem ser perdidas (Simpson, 1981). Um enfoque reducionista terá sucesso limitado porque o balanço ótimo da conservação de água e a absorção de carbono são alcançados, não pela variação de uma única resposta, mas pela combinação de diversas respostas diferentes a um nível que equivale à severidade e à duração do déficit hídrico (McCree e Fernandez, 1989). A maior limitação para o melhoramento genético da tolerância ao déficit hídrico em plantas é o conhecimento insuficiente sobre as bases fisiológicas, moleculares e genéticas das respostas das plantas ao déficit. Essas considerações reforçam a necessidade de um enfoque sistemático nos estudos de estresse hídrico, com maior ênfase nas diferenças genéticas entre os genótipos (van Rensburg, 1994).

Respostas Moleculares

As plantas contêm cerca de 10^{10} a

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

O déficit hídrico em plantas inicia um complexo de respostas, começando com a percepção do estresse, o qual desencadeia uma cascata de eventos moleculares que é finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento (Bray, 1993). As rotas de transmissão dos sinais moleculares de percepção do estresse (*signal-transduction pathways*) em plantas não têm sido muito estudadas. Entretanto, os modelos propostos para animais, leveduras e bactérias assemelham-se entre si, sugerindo que, provavelmente, os sistemas vegetais de percepção de estresse também sejam semelhantes aos da maioria dos seres vivos (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1999).

Os modelos de percepção do estresse sendo estabelecidos para vegetais superiores mostram que a mudança no volume de células individuais de uma raiz ou outro órgão submetido à desidratação altera o potencial de pressão (tensão física; turgor) e o potencial osmótico (concentração) dessas células. Isso provoca alterações na membrana celular e em vários de seus componentes, assim como na concentração celular de metabólitos. Alterações na conformação da membrana celular provoca mudanças em canais de transporte ativados por pressão, modifica a conformação ou a justaposição de proteínas sensoriais críticas embebidas nas membranas celulares, e altera a continuidade entre a parede celular e a membrana celular. Essas modificações ativam complexos enzimáticos, que iniciam uma cascata de eventos moleculares e que levam à indução da expressão de várias categorias de genes (Hare et al., 1996; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1996, 1997, 1999). Alguns dos

mecanismos de percepção que estão sendo estudados hoje em plantas são: a atividade de kinases de histidina, envolvendo a proteína sensora EnvZ e o fator de transcrição OmpR (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1999); as kinases ativadas por Mitogen, *MAPK - Mitogen-Activated Protein Kinase* (Jonak et al., 1996); as kinases dependentes de cálcio (Urao et al., 1994); a Fosfolipase C, atuando no metabolismo de produção de Inositol di e tri-fosfato e sua função nas liberações de cálcio no citoplasma, onde cálcio e calmodulin funcionariam como uma chave molecular na rota de transmissão do sinal de estresse (Munnik, et al., 1998); as proteínas DREB, que aderem a seqüências de ADN presentes em regiões promotoras de genes expressos durante a desidratação, as *Dehydration Responsive Elements Binding proteins - DREB proteins* (Kasuga et al., 1999); as seqüências promotoras responsivas ao ácido abscísico (*Abscisic Acid - ABA*) (Abe et al., 1997); etc.

Genes induzidos pelo déficit hídrico promovem: tolerância da célula à desidratação; funções de proteção no citoplasma; alterações no potencial osmótico celular para aumentar a absorção de água; controle da acumulação de íons; regulação adicional de expressão gênica; metabolização de compostos degradados pelo estresse; etc (Bray, 1993; Bray, 1997; Nepomuceno et al., 2000). Acredita-se que muitos dos produtos de genes induzidos pelo déficit hídrico possam proteger as estruturas celulares dos efeitos da perda de água (Boyer, 1996; Alvin et al., 2001). Entretanto, a expressão dos genes durante o estresse não garante que um produto gênico promova a habilidade da planta em sobreviver ao estresse (Bray, 1993). A expressão de alguns genes pode resultar de ferimento ou dano que tenha ocorrido durante o estresse. No entanto, alguns genes são necessários para a tolerância ao estresse, e a acumulação dos produtos da expressão desses genes pode tornar-se uma resposta adaptativa (Bray, 1993; Bray, 1997), assim como a desativação da expressão de um gene pode também estar ligada ao aumento da tolerância ao estresse (Nepomuceno et al., 2000).

Ajuste Osmótico

Uma das mais bem documentadas respostas fisiológicas/moleculares ao déficit hídrico em plantas é a habilidade de

algumas espécies de ajustar osmoticamente suas células. Durante a seca, plantas superiores ativamente acumulam açúcares, ácidos orgânicos e íons no citosol para diminuir o potencial osmótico e, conseqüentemente, manter o potencial hídrico e o turgor de suas células próximo do nível ótimo (Bray, 1993, 1997). Quando o turgor é mantido, processos como condutância estomática, taxa de assimilação de CO₂ e expansão dos tecidos são total ou parcialmente mantidos (Ludlow, 1987; Nepomuceno et al., 1998).

Mudanças no potencial osmótico causado pela concentração de solutos, resultante da perda de água e aquelas causadas pela acumulação ativa de solutos são distintas. Na ausência de acumulação de solutos o potencial osmótico é inversamente relacionado com o volume osmótico. Reduções no potencial osmótico ocorrem pelo aumento na concentração de solutos presentes na célula túrgida. O ajuste osmótico, portanto, ocorrerá somente se ocorrer a acumulação ativa de solutos, propiciando, em várias espécies (Guo e Oosterhuis, 1997), o aumento na capacidade de tolerar períodos curtos de seca. Existe considerável variação, entre diferentes culturas, na capacidade de ajuste osmótico e isso deve ser considerado ao se medir a habilidade da cultura em suportar a seca. Tem sido observada alta capacidade de ajuste osmótico em espécies como o sorgo e o algodão; ajustes mais moderados são observados em girassol, enquanto o trigo e a soja normalmente apresentam baixa capacidade de ajuste (Oosterhuis e Wullschlegel, 1988).

A capacidade de aumentar a tolerância à seca ocasionada pelo ajuste osmótico em algumas espécies tem sido relacionada com a diminuição do potencial osmótico e com a retenção de água dela decorrente (Jamaux et al., 1997). Entretanto, a geração de moléculas que buscam e destroem (*scavenging*) radicais livres pode, também, ser uma das causas da redução do potencial. O estresse hídrico quebra o equilíbrio oxidativo/reduutivo (redox) em várias organelas celulares, como os cloroplastos. O declínio na funcionalidade dos cloroplastos, inevitavelmente, leva à geração de espécies com radicais de oxigênio altamente reativos (Hare et al., 1996). Assim, a real função do ajuste osmótico poderia estar potencialmente ligada à eliminação de radicais livres,

mas gerando, como função adicional, a retenção de água (Hare e Cress, 1997).

Proteínas *Lea*

(Late embryogenesis abundant)

Um grupo de genes que têm sido considerados como adaptativo à seca e que tem sido identificado em vários trabalhos que analisam respostas de plantas à falta de água, codifica as proteínas *Lea*. Essas proteínas foram identificadas, pela primeira vez, como genes expressos durante as fases de maturação e dessecação do desenvolvimento de sementes (Bray, 1993; Bohnert et al., 1995; Zhu et al., 1997). A maioria dos produtos dos genes *Lea* é predominantemente hidrofílica, básica na composição de aminoácidos, sem *Cys* e *Trp* e com localização no citoplasma (Dure, 1993). Proteínas *Lea* podem ser categorizadas em, no mínimo, seis subgrupos, baseados na seqüência de aminoácidos e na sua cinética da expressão (Dure, 1993). Muitos estudos sobre *Lea* e outras proteínas relacionadas com a desidratação mostram que proteínas similares se acumulam quando o sinal do ambiente é déficit hídrico, baixas temperaturas, pressão osmótica externa aumentada, dessecação do embrião ou aplicação do hormônio vegetal *ABA* (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1996). As prováveis funções dos genes *Lea* são relacionadas com seqüestro de íons, proteção de membranas e natureza de proteínas (chaperonas) e retenção de água (Bray, 1993; Dure, 1993; Zhu et al., 1997). Possivelmente, esse grupo diverso de proteínas serve a mais de uma simples função (Zhu et al., 1997). Entretanto, a extrema hidrofília apresentada por quase todas as proteínas *Lea* e sua expressão abundante durante a maturação e o estresse de dessecação celular (Dure, 1993), certamente implica na função de proteção das estruturas celulares.

Proteínas de Choque Térmico

Proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins – HSP*) são outro grupo de produtos de genes usualmente encontrados em plantas submetidas ao déficit hídrico (Joshi e Nguyen, 1996). Como o nome sugere, *HSP* foram identificadas pela primeira vez como respostas ao estresse de calor. Entretanto, a habilidade de responder ao choque de temperatura moderada pela síntese

de *HSP*, dentro de duas horas do choque, é uma resposta geral que tem sido também observada em micróbios, em animais e em plantas submetidas ao déficit hídrico (Harborne, 1997). O tratamento de plantas de soja por duas horas a 40 °C faz com que tolerem temperaturas de 45 °C por outras duas horas. Tipicamente, sem esse pré-tratamento, plantas de soja não sobrevivem a uma exposição direta a 45 °C (Harborne, 1997).

As *HSP* são altamente conservadas e diversas classes têm sido descritas em eucariotos, inclusive em plantas. Elas são designadas pelos seus pesos moleculares aproximados em kDa (e.g., *HSP110*, *HSP90*, *HSP70*, *HSP60*) (Cooper, 1997). As famílias de *HSP70* e *HSP60* parecem ser particularmente importantes nas rotas gerais de dobramento (natureza) de proteínas em células de eucariotos e procariotos. Ambas as famílias funcionam ligando-se às regiões não dobradas das cadeias peptídicas, sugerindo que sua função possa estar relacionada com a manutenção da correta estrutura terciária de certas proteínas (Cooper, 1997).

A maior parte das *HSP* provavelmente funcione como chaperones, que ajudam no correto dobramento ou na prevenção da desnaturação das proteínas (Zhu et al., 1993). Apesar de algumas *HSP* ser normalmente produzidas pela célula, durante situações de estresse há um aumento na produção de *HSP*. Como o estresse promove a desnaturação e a agregação de proteínas, uma maior síntese de *HSP* ajudaria a proteger essas proteínas durante o estresse osmótico que ocorre após a desidratação da célula (Zhu et al., 1997).

Prolina

Uma das mais bem estudadas respostas das plantas ao déficit hídrico é a acumulação de prolina nas células. A acumulação desse aminoácido é resultado do aumento no fluxo de glutamato, que é metabolizado pela Pirrolina-5-Carboxilato Sintetase (P5CS), enzima que regula a taxa de biossíntese de prolina (Hare e Cress, 1997), bem como de um decréscimo no catabolismo da prolina (Stewart et al., 1977). A enzima Pirrolina-5-Carboxilato Redutase (P5CR), responsável pela transformação da Pirrolina-5-Carboxilato (P5C) em prolina, tem sua expressão regulada por mudanças no potencial osmótico do cito-

plasma (Williamson e Slocum 1992). Um decréscimo no potencial osmótico da célula leva a um aumento na síntese de P5C e, conseqüentemente, a um aumento na síntese de prolina. A acumulação de prolina em células vegetais submetidas a estresse hídrico tem sido sugerida como um mecanismo de ajuste osmótico (Delauney e Verma, 1993). Entretanto, alguns autores sugerem outras funções para o acúmulo de prolina, como: estabilizador de estruturas sub-celulares (Schobert e Tschesche, 1978); *scavenger* de radicais livres (Saradhi et al., 1995); depósito de energia (Hare e Cress, 1997); componente da cascata de sinalização molecular do estresse (Werner e Finkelstein, 1995); e constituinte principal de proteínas da parede celular de plantas (Nanjo et al., 1999). Enquanto vários trabalhos indicam uma alta correlação entre o acúmulo de prolina e o aumento da tolerância à seca, outros sugerem que o acúmulo é simplesmente um efeito do estresse (Delauney e Verma, 1993; Madan et al. 1995).

Assim como o acúmulo de prolina, o acúmulo de polióis, tais como manitol, sorbitol, inositol, mio-inositol e pinitol (e seus derivados), também tem sido correlacionado com a tolerância à seca e/ou à salinidade (Bohnert et al., 1995; Guo e Oosterhuis, 1997).

Aquaporinas

(Water Channel proteins)

A regulação do potencial osmótico e a compartimentalização de íons ocorre à custa do gradiente eletroquímico de H⁺ e do controle integrado de diferentes ATPases e de outros transportadores associados com membranas celulares (Bray, 1993). Alguns desses transportadores são proteínas de estrutura semelhante à tubular, que atravessam as membranas celulares. Membros dessa família de proteínas, também chamadas de Aquaporinas, formam canais água-específicos para íons ou solutos (Bray, 1993), como observado com a proteína *γ-TIP (Tonoplast Intrinsic Protein)*, que forma canais água-específicos quando expressa em células modelo de *Xenopus oocytes*. À medida que as proteínas canal acumulam-se no tonoplasto (membrana do vacúolo) durante o estresse, o movimento da água e dos solutos do vacúolo para o citoplasma é promovido alterando tanto o teor de água quanto o potencial osmótico do citoplasma (Mau-

rel et al., 1993). Yamada et al. (1995) identificaram transcritos (ARNm) de proteínas, *major intrinsic proteínas (MIP)*, cuja abundância muda sob estresse de salinidade em plantas de gelo (*Mesembryanthemum crystallinum*) que são adaptadas ao crescimento em altos níveis de sódio, sob seca e baixas temperaturas. Essas *MIP's* mostram homologia com aquaporinas de plantas que foram encontradas, principalmente, em células envolvidas no fluxo hídrico, tais como as da epiderme da raiz, as de pontas de raiz, e as de áreas circundantes às células do xilema em raízes (Bohnert et al., 1995). Canais de água facilitam o fluxo hídrico ao longo do gradiente osmótico existente. A expressão de aquaporinas do tonoplasto e da membrana celular (plasmalema) tem sido correlacionada também com a elongação celular (Yamaguchi-Shinozaki et al., 1992; Daniels et al., 1994).

Ácido Abscísico

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

Muitas as mudanças nos níveis de ARNm observadas durante a seca refletem ativação transcricional (Ingram e Bartels, 1996). Tratamento com *ABA* pode, também, induzir essas mudanças. Assim, seqüências de ADN atuando em *cis* ou *trans* (*cis- / trans-acting elements*) envolvidos na expressão gênica induzida pelo *ABA* podem agora ser estudadas (Ingram e Bartels, 1996). O elemento *cis-* mais bem caracterizado no contexto de resposta à aplicação de *ABA* é o elemento *ABRE* (*ABA Responsive Element*), que contém a seqüência palindrômica conservada ACGTGGC (Abe et al., 1997). Essa seqüência tem

sido encontrada na região promotora de genes induzidos pelo *ABA* (Ingram e Bartels, 1996). Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki (1999) sugerem que genes induzidos por deficiência hídrica são ativados por duas rotas de percepção e transmissão do sinal de estresse: uma *ABA*-dependente e outra *ABA*-independente.

Açúcares

Açúcares solúveis têm sido também relatados como agentes protetores durante a desidratação celular (Leprince et al., 1993; Boyer, 1996). A trehalose é um dos mais efetivos osmoprotetores, em termos de concentração mínima requerida. É um disacárido que, por várias décadas, tem sido relatado em bactérias, fungos e leveduras como um dos responsáveis pela capacidade desses organismos de tolerar altos níveis de desidratação (Müller et al., 1995). Somente no final da década passada foi identificado em plantas superiores (Goddijn et al., 1997). A dificuldade na identificação de trehalose, provavelmente, foi devido à alta atividade da enzima trehalase em plantas superiores. Trehalose liga-se às membranas celulares e diminui sua temperatura de fusão, mantendo-as, assim, na sua fase líquido-cristalina. (Crowe et al., 1993). Além disso, age como estabilizador de enzimas (Carpenter et al., 1987) e vesículas (Crowe et al., 1983) durante a desidratação, o que permite que a célula mantenha suas funções por períodos maiores.

Durante déficit hídrico moderado, o potencial hídrico pode ser mantido pelo ajuste osmótico e os açúcares podem servir como solutos compatíveis baixando o potencial. Exemplos disso estão em plantas ressurectas, como *Cratogeomys plantagineum* e plantas sensíveis à seca, como espinafre (*Spinacea oleracea*), que aumentam a síntese de sacarose durante o déficit hídrico (Ingram e Bartels, 1996).

Outra interessante forma dos açúcares protegerem as células durante a desidratação é pela formação de estruturas vítreas. Ao invés da cristalização de solutos, através da presença de açúcares, um líquido supersaturado é produzido com propriedades mecânicas de um sólido (Koster, 1991). Esse tipo de estrutura tem sido associado com a manutenção da viabilidade de sementes de milho (Williams e Leopold, 1989).

Outros Genes Expressos Durante o Déficit Hídrico

Ubiquitina é um polipeptídeo com 76 aminoácidos e tem sido encontrado em todos os eucariotos. Sua seqüência de aminoácido é uma das mais bem conservadas na natureza. O seu papel é o de "etiquetar" proteínas que estão destinadas a ser rapidamente proteolizadas no citosol (Lam, 1997). Assim, sua expressão é usualmente observada durante o déficit hídrico (Bray, 1993; Zhu et al., 1997).

Como a degradação de proteínas é geralmente alta durante a desidratação celular, seria de se esperar que sistemas de reparo sejam normalmente expressos durante situações de estresse. Um exemplo que ilustra essa situação é a observação de que a produção da enzima L-Isoaspartil metiltransferase é induzida durante a desidratação celular. Essa enzima converte resíduos modificados de L-isoaspartil em proteínas danificadas, transformando-os novamente em resíduos de L-aspartil e, assim, restabelecendo a atividade da proteína que estava danificada (Mudgett e Clarke, 1994).

Considerações Finais

Previsões ambientais sinalizam para um recrudescimento do aquecimento global nas próximas décadas e situações de secas, muito provavelmente, acompanharão esse evento. O desenvolvimento de novos genótipos de plantas, mais tolerantes a períodos prolongados de déficit hídrico, será essencial para que a agricultura continue alimentando e vestindo a crescente população mundial, assim como, gerando empregos e movimentando a economia mundial. O uso de técnicas agrônomicas novas e tradicionais, que reduzam as perdas na agricultura e aumentem a produtividade deverá ter prioridade entre as estratégias governamentais das nações. Nesse contexto, a biotecnologia, em especial a biologia molecular, terá papel fundamental no futuro da agricultura mundial. O conhecimento nessa área ainda é incipiente. A evolução do conhecimento sobre os mecanismos de tolerância à seca em várias espécies, através do estudo de genomas funcionais e proteomas, fornecerá informações preciosas para o desenvolvimento de genótipos capazes de tolerar períodos de déficit hídrico sem

que a produtividade seja prejudicada substancialmente. A difusão de novas técnicas moleculares, como os microarranjos de ADN (*DNA Microarrays*), está permitindo a identificação de rotas metabólicas ativas ou desativadas, assim como, a visualização das centenas de interações que ocorrem, em âmbito transcricional e proteômico, em resposta a eventos de estresse. Com isso, está sendo possível delinear estratégias que visem a aumentar a tolerância às condições de estresse ambiental. Essas estratégias vêm através de métodos tradicionais de melhoramento genético, facilitadas pelo uso de marcadores moleculares ligados a genes individuais ou ligados a lócus de características quantitativas (QTL) de importância, ou através do uso da engenharia genética. Genes identificados em mecanismos de tolerância têm mostrado potencial para ser usados em estudos de transformação de plantas. As primeiras plantas geneticamente modificadas para tolerância à seca já estão sendo desenvolvidas com sucesso em laboratório. Estratégias como o uso de moléculas chaperonas, que protegem componentes celulares durante a desidratação (Alvin et al., 2001), ou estratégias que amplificam o sinal molecular da percepção do estresse hídrico, permitindo a planta antecipar e acelerar os mecanismos de defesa (Kasuga et al, 1999), já são uma realidade. Entretanto, ainda devem ser testados quanto à produtividade nos campos de produção agrícola. Alcançar esse tipo de resultado e obter plantas cada vez mais eficientes na tolerância aos estresses do ambiente somente está sendo possível devido à compreensão dos mecanismos moleculares de tolerância discutidos nesta revisão e dos mecanismos que serão desvendados nas próximas décadas.

REFERÊNCIAS

- ABE, H., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., URAO, T., IWASAKI, T., HOSOKAWA, D., SHINOZAKI, K. 1997. Role of *Arabidopsis* MYC and Homologs Drought - and Abscisic Acid - Regulated Gene Expression. *The Plant Cell*, 9:1859-1868.
- ALVIM, P. T. 1985. *Theobroma cacao*. In A. H. Halevy (ed.) Handbook of flowering. CRC Press, Boca Raton, FL.
- ALVIN, F. C., CAROLINO, S. M. B., CASCARDO, J. C. M., NUNES, C. C., MARTINEZ, C. A., OTONI, W. C., FONTES, E. P. B. 2001. Enhanced Accumulation of BiP in Transgenic Plants Confers Tolerance to Water Stress. *Plant Physiology*, 126:1042-1054.
- ARTECA, R. N. 1996. Plant growth substances: Principles and applications. Chapman & Hall, New York, NY.
- BASNAYAKE, J., COOPER, M., LUDLOW, M. M., HENZELL, R. G., SNELL, P. J. 1995. Inheritance of osmotic adjustment to water stress in three grain sorghum crosses. *TAG* 90:675-682.
- BOHNERT, H. J., D. E. NELSON, R. G. JENSEN. 1995. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell*. 7:1099-1111.
- BOYER, J. S. 1996. Advances in drought tolerance in plants. *Adv. Agron.* 56:187-218.
- BRAY, E. A. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103:1035-1040.
- BRAY, E. A. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*. 2:48-54.
- CARPENTER, J. F., CROWE, L. M., CROWE, J. H. 1987. Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze-drying: Characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. *Biochim. Biophys. Acta*. 923:109-15.
- COOPER, G. M. 1997. The cell: A molecular approach. ASM Press, Washington, D.C. 673pp.
- CROWE, J. H., CROWE, L. M., JACKSON, S. A. 1983. Preservation of functional activity in lyophilized sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* 220:477-84.
- CROWE, J. H., CROWE, L. M., LESLIE, S. B., FISK, E. 1993. Mechanisms of stabilization of dry biomolecules in anhydrobiotic organisms. p. 11-20. In T. J. Close, and E. A. Bray (eds.) *Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress*. Amer. Soc. Plant Physiol., Rockville, MD.
- DANIELS, M. J., MIRKOV, T. E., CHRISTPEELS, M. J. 1994. The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP. *Plant Physiol.* 106:1325-1333.
- DELAUNEY, A., VERMA, D. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4:215-223.
- DURE, L. I. 1993. Structural motifs in *Lea* proteins. p. 91-103. In T. J. Close, and E. A. Bray (eds.) *Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress*. Amer. Soc. Plant Physiol., Rockville, MD.
- GODDIJN, O. J. M., VERWOERD, T. C., VOOGD, E., KRUTWAGEN, R. W. H. H., GRAAF, P. T. H. M., POELS, J., van DUN, K., PONSTEIN, A. S., DAMM, B., PEN, J. 1997. Inhibition of Trehalase Activity Enhances Trehalose Accumulation in Transgenic Plants. *Plant Physiol.* 113:181-190.
- GUO, C., OOSTERHUIS, D. M. 1997. Effect of water-deficit stress and genotypes on pinitol occurrence in soybean plants. *Environ. Exp. Bot. Environ. Exp. Bot.* 37:2-5.
- HARBORNE, J. B. 1997. Biochemical plant ecology. p. 501-516. In P. M. Dey, and J. B. Harborne (eds.) *Plant Biochemistry*. Academic Press, San Diego, CA.
- HARE, P., PLESSIS, S. D., CRESS, W., STADEN, J. V. 1996. Stress-induced changes in plant gene expression. *S. Afr. J. Sci.* 92:431-439.
- HARE, P. D., CRESS, W. A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21:79-102.
- INGRAM, J., BARTELS, D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:377-403.
- INGROUILLE, M. 1992. Diversity and evolution of land plants. Chapman & Hall, London, UK.
- JAMAUX, I., STEINMETZ, A., BELHASSEN, E. 1997. Looking for molecular and physiological markers of osmotic adjustment in sunflower. *New Phytol.* 137:117-127.
- JONAK, C., KIEGERL, M., LIGTERINK, W., BARKER, P. J., HUSKISSON, N. S., HIRT, H. USA 1996. Stress signaling in plants: a MAP kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Acad. Sci.* 93:11274-11279.
- JOSHI, C. P., NGUYEN, H. T. 1996. Differential display-mediated rapid identification of different members of a multigene family, HSP16.9 in wheat. *Plant Mol. Biol.* 31:575-584.
- KASUGA, M., LIU, Q., MIURA, S., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature biotechnology*. 17:287-291.
- KOSTER, K. L. 1991. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol.* 96: 302-4.
- KRAMER, P. J. 1983. Water relations of plants. Academic Press, Orlando, FL.

- KRAMER, P. J., BOYER, J. S. 1995. Water relations of plants and soils. Academic Press, Inc., San Diego, CA.
- LAM, E. 1997. Nucleic acids and proteins. p. 315-352. *In* P. M. Dey and J. B. Harborne (eds.) Plant Biochemistry. Academic Press, San Diego, CA.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. 1993. Cell. p. 21-55. *In* A. L. Lehninger, D. L. Nelson and M. M. Cox (eds.) Principles of Biochemistry. Worth Publishers, New York, NY.
- LEPRINCE, O., HENDRY, G. A., F., MCKERSIE, B. D. 1993. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci. Res.* 3:231-46.
- LIANG, P., PARDEE, A. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.* 257:967-971.
- LUDLOW, M. 1987. Contribution of osmotic adjustment to the maintenance of photosynthesis during water stress. p. 161-168. *In* J. Biggens (ed.) Progress in Photosynthesis Research. Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands.
- MADAN, S., NAINAWATEE, H.S., JAIN, R.K., CHOWDHURY, J.B. 1995. Proline and proline metabolizing enzymes in in-vitro selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress. *Ann. Bot.* 76:51-57.
- MAUREL, C., REIZER, J., SCHROEDER, J. I., CHRISPEELS, M. J. 1993. The vacuolar membrane protein - TIP creates water specific channels in *Xenopus oocytes*. *EMBO J.* 12:2241-2247.
- MCCREE, K., FERNANDEZ, C.J. 1989. Simulation model for studying physiological water stress responses of whole plants. *Crop Sci.* 29:353-360.
- MUDGETT, M. B., CLARKE, S. 1994. Hormonal and environmental responsiveness of a developmentally regulated protein repair L-isospartyl methyltransferase in wheat. *J. Biol. Chem.* 269:25605-12.
- MÜLLER, J., BOLLER, T., WIEMKEN, A. 1995. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Science* 112: 1-9.
- MUNNIK, T., IRVINE, R.F., MUSGRAVE, A. 1998. Phospholipid signaling in plants. *Biochem Biophys Acta* 1389: 222-272.
- NANJO, T., KOBAYASHI, M., YOSHIBA, Y., SANADA, Y., WADA, K., TSUKAYA, H., KAKUBARI, Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. 1999. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 18:(2)185-193.
- NEPOMUCENO, A. L., OOSTERHUIS, D. M., STEWART, J. M. 1998. Physiological responses of cotton leaves and roots to water deficit induced by polyethylene glycol. *Environmental and Experimental Botany*, 40:29-41.
- NEPOMUCENO A.L., STEWART J.M., OOSTERHUIS D.M., TURLEY R., NEUMAIER N., FARIAS J.R.B. 2000. Isolation of a cotton NADP(H) oxidase homologue induced by drought stress. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.* 35(7):1407-1416.
- OOSTERHUIS, D., WULLSCHLEGER, S.D. 1988. Drought tolerance and osmotic adjustment of various crops in response to water stress. *Arkansas Farm Research*, Jan-Feb, p. 12.
- PEARSON, L. C. 1995. The diversity and evolution of plants. CRC Press, Boca Raton, FL.
- van RENSBURG, L. 1994. Adaptive significance of photosynthetic and metabolic regulation in *Nicotiana tabacum* L. plants during drought stress. Ph.D. Diss., Potchefstroom University for Christian Higher Education, Potchefstroom, South Africa.
- SARADHI, P.P, ALIA, ARORA, S., PRASAD, K.V.S.K. 1995. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209:1-5.
- SCHOBERT, B., TSCHESCHE, H. 1978. Unusual solution properties of proline and its interactions with proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* 541:270-277.
- SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 1996. Molecular responses to drought and cold stress. *Current Opinion in Biotechnology* 7:161-167.
- SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115:327-334.
- SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 1999. Molecular responses to drought stress. *In: Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants.* Biotechnology Intelligence Unit, R.G. Landes Company, Austin, Texas, USA.
- SIMPSON, G. M. 1981. Water Stress on Plants. Praeger Publishers, New York, NY.
- STEWART, C. R., S. F. BOGGESS, D. ASPINALL, L. G. PALEG. 1977. Inhibition of proline oxidation by water stress. *Plant Physiol.* 59:930-932.
- URAO, T., KATAGIRI, T., MIZOGUCHI, T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., HAYASHIDA, N., SHINOZAKI, K. 1994. Two genes that encode Ca²⁺-dependent protein kinase are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 224: 331-340.
- WERNER, J.E., FINKELSTEIN, R.R. 1995. *Arabidopsis* mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiol. Plant Mol. Biol.* 34:913-922.
- WILLIAMS, R. J., LEOPOLD, D A. C. 1989. The glassy state in corn embryos. *Plant Physiol.* 89:977-81.
- WILLIAMSON, C. L., SLOCUM, R. D. 1992. Molecular cloning and evidence for osmoregulation of the γ -pyrroline-5-carboxylate reductase (proC) gene in Pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* 100:1464-1470.
- WU, Y., KUZMA, J., MARÉCHAL, E., GRAEFF, R., LEE, H. C., FOSTER, R., CHUA, N. 1997. Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* 278:2126-2130.
- YAMADA, S., KATSUHARA, M., KELLY, W., MICHALOWSKI, C. B., BOHNERT, H. 1995. A family of transcripts encoding water channels proteins: Tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* 7:1107-1112.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., KOIZUMI, M., URAO, S., SHINOZAKI, K. 1992. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol.* 33:217-224.
- ZHU, J. K., SHI, J., BRESSAN, R. A., HASEGAWA, P. M. 1993. Expression of an *Atriplex nummularia* gene encoding a protein homologous to the bacterial molecular chaperone Dna. *J. Plant Cell* 5:341-349.
- ZHU, J., HASEGAWA, P. M., BRESSAN, R. A. 1997. Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16:253-277. 