AMANDA ALVES DE PAIVA ROLLA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, FISIOLÓGICA E AGRONÔMICA DE LINHAGENS DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA COM A CONSTRUÇÃO *rd29A*:*At*DREB1A VISANDO TOLERÂNCIA A SECA

Londrina
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

AMANDA ALVES DE PAIVA ROLLA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, FISIOLÓGICA E AGRONÔMICA DE LINHAGENS DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA COM A CONSTRUÇÃO *rd29A*:*At*DREB1A VISANDO TOLERÂNCIA A SECA

Londrina
2013

AMANDA ALVES DE PAIVA ROLLA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, FISIOLÓGICA E AGRONÔMICA DE LINHAGENS DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA COM A CONSTRUÇÃO *rd29A*:*At*DREB1A VISANDO TOLERÂNCIA A SECA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Alexandre Lima Nepomuceno
Co-orientadora: Dra. Renata Fuganti Pagliarini

Londrina
2013

Catalogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R749c Rolla, Amanda Alves de Paiva.
Caracterização molecular, fisiológica e agronômica de linhagens de soja geneticamente modificada com a construção *rd29A*:*At*DREB1A visando tolerância a seca / Amanda Alves de Paiva Rolla. – Londrina, 2013.
128 f : il.

Orientador: Alexandre Lima Nepomuceno.
Coorientador: Renata Fuganti-Pagliarini.
Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Soja – Melhoramento genético – Teses. 2. Soja – Condições hídricas – Teses. 3. Plantas – Resistência à seca – Teses. 4. Plantas transgênicas – Teses. I. Nepomuceno, Alexandre Lima. II. Fuganti-Pagliarini, Renata. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Instituto Agronômico do Paraná. V. EMBRAPA. VI. Título.

CDU 631.52:633.34

AMANDA ALVES DE PAIVA ROLLA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, FISIOLÓGICA E AGRONÔMICA DE LINHAGENS DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA COM A CONSTRUÇÃO *rd29A*:*At*DREB1A VISANDO TOLERÂNCIA A SECA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

_____

Coorientadora: Dra. Renata Fuganti Pagliarini
EMBRAPA-Soja

_____

Dr. Hugo Bruno Correa Molinari
EMBRAPA-Agroenergia

_____

Dra. Josirley de Fátima Corrêa Carvalho
EMBRAPA-Soja

_____

Dra. José Renato Bouças Farias
EMBRAPA-Soja

_____

Dra. Anelise da Silva Cruz
EMBRAPA-Soja

Londrina, 28 de março de 2013.

DEDICO e OFEREÇO

A minha amada filha Laura, pelo seu lindo sorriso de todas as manhãs.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente em todos os momentos, me abençoando, me dando força e superar todos os obstáculos.

À Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade de enriquecer meu conhecimento, usufruir de sua estrutura e da competência dos docentes.

À Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular a professora Dra. Ana Lúcia Dias pela ajuda prestada em especial a Secretária da Pós Graduação Sueli, pela atenção em todos os momentos que precisei.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Embrapa Soja de Londrina, pela infra-estrutura laboratorial, suporte imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao, meu orientador Dr. Alexandre Lima Nepomuceno pela oportunidade oferecida pela orientação, confiança e credibilidade fundamental para o desenvolvimento desse trabalho.

A co-orientadora Dra. Renata Fuganti Pagliarini por toda ajuda, paciência, intermináveis correções, prestatividade e amizade.

A Dra. Josirley de Fátima Corrêa Carvalho pelo auxílio na elaboração e análise dos experimentos de fisiologia, pela atenção em todos os momentos, sempre com muita paciência e pela grande amizade.

A JICA/JST pela experiência única de conhecer e desenvolver uma parte desse trabalho em Tsukuba –Japão.

Ao laboratório da Dra. Kazuko Yamaguchi Shinozaki no instituto Jircas, onde foi possível desenvolver parte do trabalho.

À Dra. Maria Cristina pela ajuda na elaboração dos experimentos e nas análises estatísticas, tirando minhas dúvidas sempre com muita paciência.

Aos meus amados pais, Carlos Magno e Lusimar pelo amor incondicional, por acreditarem em meu potencial, sempre me apoiando e que nunca mediaram esforços em me ajudar a alcançar meus objetivos.

A minha querida irmã Samantha e meu cunhado Leandro pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

A minha tia Dra. Luzinete Alves Silva pela amizade por todos os conselhos, incentivo em meus estudos.

Ao meu esposo Antonio Alberto dos Santos pelo amor, companheirismo, paciência, amizade, cumplicidade e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos. Sem você eu não teria conseguido! Te Amo!

Aos queridos amigos Águida Morales e Alan Pereira por me ajudarem nos momentos mais difíceis, dando seu apoio, incentivo em todos os momentos.

A querida amiga, Noelle Giacomini, nunca imaginei que no Japão eu iria encontrar uma pessoa tão especial. Obrigada por sempre estar ao meu lado dando seu apoio, carinho e incentivo. Saudades sempre!

A querida amiga Larissa Girotto, pelo carinho e por sempre me ouvir quando precisei.

A querida amiga Valéria Lopes Caitar, pela ajuda nas análises de Bioinformática. Obrigada pelo carinho e paciência.

A querida Cibelle Engels, pela amizade, ajuda e companheirismo durante o desenvolvimento dos experimentos. Obrigada por sempre me ouvir quando precisei.

Aos técnicos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Bioinformática da Embrapa Soja, César Silveira, Marcia, Danielle Gregório, Renan Milagres pelo apoio, e ótima convivência em especial a Silvana R. R. Marin, pela amizade, por toda ajuda, paciência e incentivo. À Vera Lúcia Pierotti, a Verinha, obrigada por suas orações e conselhos.

A inesquecível amiga Selminha (*in memoriam*), um verdadeiro anjo que agora olha por nós. Muitas saudades!

Ao Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, em especial, Claudinei, Bianca, Alexandre Rio, Marcos, Luís pelo auxílio nas análises fisiológicas e a agronômicas.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Bioinformática, Aguida Morales, Adriana Polizel, Juliane Marinho, Patrícia Honna, Gislaine Vasquez, Larissa Girotto, Luiz Fernando, Maria Cecília, Juliana Leite e Elton pelos valiosos conselhos e por me ajudarem nos trabalhos do laboratório durante a minha gravidez.

O meu muito obrigado a todos os amigos de laboratório de Biotecnologia Vegetal e Bioinformática pela ótima convivência e amizade.

Enfim, a todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

“*Nas grandes batalhas da vida o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”*

Mahatma Gandhi

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. - Redes de regulação transcricional dos sinais de estresse abiótico e expressão gênica. Representação esquemática da regulação transcricional dos elementos cis-atuantes e dos fatores de transcrição envolvidos em resposta a estresses abióticos. Adaptado de Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki (2007) 28

CAPÍTULO 1

Fig. 1: Detailed image of the greenhouse experiments using 3 Kg (a) and (1kg b) pots 69

Fig. 2: Water balance calculated according to Thornthwaite e Mather (1955). Water deficit occurred at several periods during the 2011/2012 season (black area) including at the pod filling stage 70

Fig. 3: Northern blot analysis of the DREB1A lines 71

Fig. 4: Survival rate of DREB plants (lines P58, P1142) and BR 16 after 6 days of water stress and 3 days of re-irrigation (n=10)..... 72

Fig. 5. Growth characteristics of the AtDREB1A plants and the cultivar BR16 under control (C-dark bars) and moderate water stress (DS-grey bars) in greenhouse conditions. Differences were not statistically significant (Duncan 5%) (n=6)..... 73

Fig. 6. A and gs of AtDREB1A plants and the cultivar BR16 under severe water stress in greenhouse conditions. Differences were not statistically significant (Duncan 5%) (n=6)..... 74

Fig. 7. AtDREB1A plants and the cultivar BR16 under moderate (a) and severe (b) water stress at greenhouse conditions. It can be noticed that differently from the BR 16 plants, the DREB1A plants did not show any symptoms of drought under moderate water stress. Under severe water stress wilting symptoms were similar in plants of the P1142 line and the BR 16 cultivar 75

Fig. 8. Transpiration of AtDREB1A plants and the cultivar BR16 under control conditions (a) and water stress (b). Line with x marker-P58; continuous line-P1142, line with circle marker-BR16. Days with different letters showed significance at 5% (Duncan) (n=6) 76

Fig. 9. Vapor pressure (kPa) deficit at the greenhouse 77
Fig. 10. Transpiration of AtDREB1A plants and the cultivar BR16 under control (1-6 days) and water stress (7-10 days) conditions in fitotron. Line with a circle-BR 16, line with a square-P1142, line with a triangle-P58. Different letters showed significance at 5% (Duncan) (n=6)..... 78
Fig. 11. Transpiration efficiency of AtDREB1A plants and the cultivar BR16 under water stress condition in the fitotron. Different letters showed significance at 5% (Duncan) (n=10)..... 79
Fig. 12. Relative growth ratio and percentage of growth reduction of AtDREB1A plants and the cultivar BR16 in greenhouse conditions. Color of the bars represents dark grey=control and light grey=water stress Differences were not statistically significant (Duncan 5%) (n=6)..... 80
Fig. 13. (a) Figure showing the experiment at the field conditions and the rain out shelters (b) Figure showing the slow wilting behavior of plants of the line P58 (DREB1) at field conditions..... 81
Fig. 14. Growth components of AtDREB1A plants and the cultivar BR16. The bars in each treatment represents BR16, P58 and 09D-0077 respectively from left to the right. I-irrigated, NI-non irrigated or natural drought, ER-water stress at the reproductive stage, EV-water stress at the vegetative stage. Differences were not statistically significant (Duncan 5%)..... 82
Fig. 15. Yield components of AtDREB1A plants and the cultivar BR16. The bars in each treatment represents BR16, P58 and 09D-0077 respectively from left to the right. I-irrigated, NI-non irrigated or natural drought, ER-water stress at the reproductive stage, EV-water stress at the vegetative stage. Data (bars) without letters show are not statistic significance at 5% by the Duncan test 83

CAPÍTULO 2

Fig. 1: Northern blot indicando a expressão do gene AtDREB1A nas linhagens de soja GMs P58, P1142, P59, P1142 e P3069 e na cultivar controle não transgênica BR 16, nos tempos de tratamento controle e estressado aos 4 e 6 dias de estresse de déficit hídrico 90

Fig. 2: Southern blot realizado para determinar o número de cópias do cassete inserido nas linhagens de soja GMs contendo o gene AtDREB1A..... 92
Fig. 3: Categorização funcional das sequências diferencialmente expressas nas linhagens GMs P58 (em A) e P1142 (em B) quanto aos processos biológicos (nível 3), segundo o banco de dados Gene Onthology (GO)..... 95
Fig. 4: Visualização das vias metabólicas identificadas na linhagem GM P58 através da ferramenta Mapman. Em A) 134 transcritos diferencialmente expressos relacionados a rota de resposta celular, e em B) 451 transcritos diferencialmente expressos relacionados a estresses bióticos e abióticos. O nível de expressão de cada sonda está associado a uma cor específica, vermelho é referente a transcritos que foram down-regulados, e azul é referente a transcritos que foram up-regulados 96
Fig. 5: Visualização das vias metabólicas identificadas na linhagem GM P1142 através da ferramenta Mapman. Em A) 33 transcritos diferencialmente expressos foram identificados com envolvidos na resposta celular, e em B) 104 transcritos diferencialmente expressos foram relacionados a estresse bióticos e abióticos. O nível de expressão de cada sonda está associado a uma cor específica, vermelho é referente a transcritos que foram down-regulados, e azul é referente a transcritos que foram up-regulados. Foi utilizado o genoma da soja como referência no Mapman 97
Fig. 6: Logo de Modelo de Higger Markov (HMM) obtidos pelo programa MEME, baseado na sequência consenso dos promotores dos 16 glymas preditos. Sequência conservada hipotética para domínio central DRE encontrada na região promotora dos genes identificados como diferencialmente expressos e candidatos à regulação pelo FT DREB1A. Letras de tamanho menor indicam variação de bases nitrogenadas na posição 109
Fig. 7: Identificação da posição do elementos cis-atuantes DRE, WRKY, MYB, MYC, AREB, bZIP, NAC, EREF (AP2) e orientação do gene (+/-) pelo programa Genomatix/Mainspector. O mapa gráfico demonstra a posição do cis elemento DRE, WRKY, MYB, MYC, AREB, bZIP, NAC, EREF (AP2) correspondente aos 16 genes diferencialmente expressos. Foram analisados 1000pb da região a montante do início do sítio de transcrição. As barras em coloridas correspondem a posição dos elementos DRE, WRKY, MYB, MYC, AREB, bZIP, NAC, EREF (AP2) em cada sequência..... 110

Fig. 8: Perfil de expressão dos genes candidatos à regulação gênica pelo fator de transcrição DREB1A. A primeira coluna apresenta os genes diferencialmente expressos identificados na linhagem GM P58 e a segunda coluna apresentada os genes diferencialmente expressos identificados na linhagem GM P1142 117

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tab. 1: Genes diferencialmente expressos identificados na linhagem GM P58 contendo o cis-elemento DRE na região promotora..... 101

Tab. 2: Genes diferencialmente expressos identificados na linhagem GM P1142 contendo o cis-elemento DRE na região promotor 107

Tab. 3: Genes diferencialmente expressos identificado em ambas GM contendo o cis-elemento DRE..... 118

ROLLA, Amanda Alves de Paiva. **Caracterização molecular, fisiológica e agronômica de linhagens de soja geneticamente modificadas com a construção *rd29*:*At*DREB1A visando tolerância a seca.** 2013. 128 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, 2013.

RESUMO

As mudanças climáticas decorrentes do aquecimento do planeta tem aumentado consideravelmente os eventos de seca, provocando perdas de produtividade. O fator de transcrição DREB (*Dehydration Responsive Element Binding*) ativa, em condições de restrição hídrica, a expressão de uma cascata de genes que atuam na proteção das estruturas celulares durante a desidratação. Assim, neste trabalho, as linhagens de soja DREB1A: P58 e P1142 e o cruzamento entre a cultivar convencional BR 16 e P58, 09D-0077, foram avaliadas para tolerância à seca em casa de vegetação e campo. Os resultados indicaram que as plantas DREB não superaram a cultivar convencional BR 16 em termos de rendimento, mas houve uma clara tendência de superioridade em alguns componentes de produção, tais como número de sementes, número de vagens com sementes e número total de vagens quando o estresse hídrico foi aplicado na fase vegetativa em condições de campo. Em casa de vegetação e em condições de boa disponibilidade hídrica, as plantas DREB apresentaram menores taxas de transpiração que o cultivar BR 16, sugerindo que mecanismos de conservação de água podem fazer parte das estratégias de tolerância de plantas DREB1A de soja. Análises de *Northern blot* confirmaram a expressão do transgene inserido. Um experimento de microarranjos de DNA foi realizado com linhagens GMs P58 e P1142 em condições de boa disponibilidade hídrica para se verificar a expressão de genes ativados em pela expressão basal do promotor *rd29.* Os dados indicaram 1.475 e 311 transcritos diferencialmente expressos nas linhagens P58 e P1142, respectivamente. Uma busca pelo *motif* DRE na região promotora destes genes indicou que 208 e 35 genes apresentaram o *cis*- elemento nas linhagens P58 e P1142 respectivamente. Para ambas as linhagens, 16 genes em comum diferencialmente expressos, foram identificados como tendo pelo menos, um elemento DRE na região promotora. Esses genes pertencem a rotas metabólicas envolvidas na sinalização de hormônios, rotas de estresses abióticos e bióticos, metabolismo secundário, proteínas de choque térmico dentre outras, sendo fortes candidatos para estudos futuros de validação da ativação pelo fator de transcrição DREB1A.

Palavras-chave: Déficit hícrico. DREB1A. Microarranjo. rd29A. Soja. Tolerância à seca.

ROLLA, Amanda Alves de Paiva. **Molecular, physiological and agronomical characterization of genetically modified soybean lines with *rd29*:*At*DREB1A construct aiming drought tolerance.** 2013. 128 p. Thesis (PhD in Genetics and Molecular Biology) – Londrina State University, 2013.

ABSTRACT

Climatic changes due to global warming are increasing considerably drought events in the last decades, causing yield losses. The transcription factor DREB (*Dehydration Responsive Element Binding)* activates in conditions of hydric restriction, the expression of a gene cascade which acts in the protection of cellular structures during dehydration. Thus, in this work, the soybean lines DREB1A: P58 and P1142 and a cross between the conventional cultivar BR 16 and P58, 09D-0077, were evaluated for drought tolerance in green house and field conditions. The results indicated that DREB1A plants did not outperform the cultivar BR 16 in terms of yield, but there was a clear tendency of superiority in some yield components, such as seed number, number of pods with seed, and total number of pods when drought stress was applied in the vegetative stage at field conditions. At the green house and when water was available, the DREB plants showed lower transpiration rates than the cultivar BR 16, suggesting that water conservation mechanisms may be part of the tolerance strategies of DREB1A plants of soybean. Northern blot analysis confirmed the *DREB1A* expression. A DNA microarray experiment was performed for plants of the lines P58 and P1142 under well irrigated conditions to verify the expression of genes activated by the basal expression of *rd29A* promoter. The data indicated 1.475 and 311 differentially expressed transcripts for P58 and P1142 lines, respectively. A search for the DRE motif in the promoter region of these genes indicated that 208 and 35 genes presented the *cis*-elements in the lines P58 and P1142 respectively. For both lines, 16 genes differentially expressed in common were identified as having at least one DRE element in the promoter region. These genes belong to metabolic pathways involved in hormone signalization, biotic and abiotic stress pathways, secondary metabolism, heat shock proteins among others, being strong candidates to further validation studies of DREB1A transcription factor activation.

Key words: DREB1A. Drought tolerance. Microarray. rd29 Soybean. Water deficit.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 OBJETIVO 20
2.1 Objetivo geral 20
2.2 Objetivos específicos 20

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 21
3.1 Mecanismos fisiológicos e bioquímicos de resposta ao déficit hídrico com ênfase em plantas expressando o fator de transcrição DREB1A 21
3.2 Análise da expressão gênica 24
3.2.1 Regulação gênica e os fatores de transcrição estresse responsivos 26
3.2.2 Fator de transcrição DREB 32
3.2.3 Utilização do promotor rd29A no desenvolvimento de plantas GMs 33
3.3 Análise de Bioinformática 34

4 REFERÊNCIAS 36

CAPÍTULO 1 49
5 Phenotyping DREB1A soybean plants for drought tolerance at laboratory and field 49
5.1 Abstract 49
5.2 Introduction 49
5.3 Material and Methods 51
5.3.1 Plant Material 51
5.3.2 Northern blot analysis 52
5.3.3 Recovery of DREB1A plants after water deficit 52
5.3.4 The phenotype, transpiration, relative growth ratio and percentage of reduction of growth of DREB1A plants under water stress 53
5.3.5 Transpiration, transpiration efficiency, estomatal conductance and photosynthesis under two changing conditions of vapor pressure deficits 54
5.3.6 Evaluation of growth and yield at field conditions 55
5.3.7 Statistics 56
5.4 Results 56
5.4.1 Northern blot analysis 56
5.4.2 Recovery of DREB1A plants after stress 56
5.4.3 The phenotype, transpiration, relative growth ratio and percentage of reduction of growth of DREB1A plants under water stress 57
5.4.4 Evaluation of growth and yield at field conditions 59
5.5 Discussion 60
5.6 Acknowledgments 64
5.7 References 64

CAPÍTULO 2 83
6 Caracterização do transcriptoma de linhagens de soja geneticamente modificadas (rd29A:AtDREB1A) e identificação de genes regulados pelo fator de transcrição AtDREB1A 83
6.1 Resumo 83
6.2 Introdução 84
6.3 Material e Métodos 86
6.3.1 Condições de crescimento e obtenção do material biológico 86
6.3.2 Análise da expressão do transgene AtDREB1A nas linhagens de soja GMs e na cultivar BR16 através de *Northern blot* 87
6.3.3 Análise do número de cópias inseridas do transgene AtDREB1A nas linhagens de soja GMs através de *Southern blot* 87
6.3.4 Obtenção dos perfis de expressão por Microarranjos 87
6.3.5 Análises *in silico* 88
6.3.5.1 Identificação dos genes diferencialmente expressos e anotação dos modelos gênicos 88
6.3.5.2 Análise da região montante dos genes diferencialmente expressos para identificação de *cis*-elemento DRE 89
6.4 Resultados e Discussão 89
6.4.1 Análise de expressão do transgene nas linhagens de soja e seleção para o microarranjo 89
6.4.2 Identificação do número de cópias inseridas do transgene AtDREB1A nas linhagens de soja 91
6.4.3 Identificação e categorização dos genes diferencialmente expressos nas linhagens GMs P58 e P1142 em condições ambientais normais 92
6.4.4 Vias metabólicas possivelmente moduladas pelo rd29 94
6.4.5 Análise da região *Upstream* dos genes diferencialmente expressos possivelmente regulados por rd29A:AtDREB1A 99
6.5 Referências bibliográficas 119

7 CONCLUSÃO 128

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja possui um papel significativo no agronegócio brasileiro da produção de grãos. De fato, a soja consiste em uma das *commodities* mais comercializadas internacionalmente, especialmente devido à variedade de formas de consumo, com alcance desde a nutrição humana até animal. O grão também é visto como uma importante cultura para a produção de biodiesel (PIMENTEL e PATZEK 2008). Dessa forma, o processamento do grão atinge diferentes setores industriais, tornando tal matéria-prima essencial para o desenvolvimento de economias e para o bem-estar social.

Na safra 2010/11, a produção mundial de soja ultrapassou a marca de 263 milhões de toneladas, e o Brasil, que contribui com 75 milhões de toneladas (CONAB, 2011) assumiu o segundo lugar na produção mundial, com claras indicações de se tornar o primeiro, devido às limitações de área para expansão da cultura nos demais países produtores e do domínio tecnológico que nosso país possui para produzir em regiões tropicais com baixas latitudes (DALL'AGNOL et al., 2007). Em exportações, o volume negociado pelo complexo soja, que envolve grão, farelo e óleo, representou em 2010 cerca de US$17,1 bilhões segundo dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MIDC).

No entanto, fatores abióticos podem provocar uma redução de até 50% nos rendimentos da soja e da maioria das culturas (BOYER, 1982; BRAY et al., 2000). Dentre esses fatores, o déficit hídrico é considerado um fator limitante para a produtividade final, afetando consideravelmente culturas economicamente importantes (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2007). Na safra 2011/12, uma redução de 8,95 milhões de toneladas ocorreu devido às condições climáticas adversas causadas pelo fenômeno "La Niña". Os efeitos foram sentidos principalmente os estados do Rio Grande do Sul, que registou perdas de 43,8% (5,09 milhões de toneladas), seguido do Paraná com redução de 29,4% (4,53 milhões de toneladas) e de Mato Grosso do Sul, estado da região Centro-Oeste, com perda de 10,5% (541,1 mil toneladas) da produção (CONAB, 2012). Para a safra 2012/13, no entanto, que não sofreu com o clima estima-se um aumento de aproximadamente 23,6% em relação à safra 2011/12 (CONAB, 2013) totalizando 82,06 milhões de toneladas colhidas.

Várias estratégias podem ser utilizadas para reduzir as perdas provocadas pela seca, desde o manejo adequado do solo e da lavoura com o uso de variedades recomendadas, até o uso de irrigação que no caso da soja, onera o custo de produção e depende da disponibilidade. De fato, quanto mais mecanismos de redução de perdas forem utilizados em conjunto, menores as chances do produtor arcar com grandes prejuízos de produção e financeiros. Neste

contexto, as ferramentas biotecnológicas tornaram-se indispensáveis no desenvolvimento de variedades mais adaptadas às diferentes condições de estresses bióticos e abióticos como a seca (NEPOMUCENO et al., 2009), uma vez que, plantas mais tolerantes teriam o período entre o início do déficit e o abortamento de flores e legumes prolongado, e muito provavelmente as perdas em produtividade seriam menores, pois, com o decorrer dos dias, aumentariam as chances de ocorrência de novas chuvas.

Grupos de pesquisas em todo mundo têm direcionado seus trabalhos, visando o desenvolvimento de estratégias moleculares para desenvolver cultivares mais tolerantes. As Plantas Geneticamente Modificadas (PGMs), com características melhoradas de tolerância seca, podem contribuir para amenizar os problemas decorrentes do déficit hídrico. Estudos moleculares de regulação gênica vegetal em plantas submetidas a privação hídrica revelaram alguns genes responsivos à desidratação. A família dos fatores de transcrição DREBs (*Dehydration Responsive Element Binding protein – Elemento de ligação responsivo à desidratação*), é chave na ativação em cascata de vários genes que apresentam características de proteção das estruturas celulares durante a desidratação (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000). Alguns trabalhos demonstraram que o fator de transcrição *DREB1A* sob controle do promotor estresse induzido *rd29,* aumentou a tolerância à seca, a salinidade e ao frio em *Arabidopsis thaliana* (LIU et al., 1998; JAGLO-OTTONSEN et al., 1998; GILMOUR et al., 1998), tabaco (KASUGA et al., 2004), arroz (DUBOUZET et al., 2003; OH et al., 2005; ITO et al., 2006), milho (QIN et al., 2004; 2007) e trigo (PELLEGRINESCHI et al., 2004). Para a soja, Beneventi e colaboradores (2006), obtiveram por transformação genética, via biobalística, várias linhagens de soja contendo a construção gênica *rd29A:AtDREB1A*. Experimentos conduzidos em casa de vegetação indicaram que a linhagem P58 apresentou maior tolerância à seca quando comparada a cultivar convencional não transgênica, BR 16 (POLIZEL et al., 2011).

Neste contexto científico de busca por novas estratégias no desenvolvimento de plantas mais adaptadas a condições ambientais adversas, o objetivo do presente estudo foi analisar agronômica e fisiologicamente as linhagens de soja GMs contendo a construção *rd29A:AtDREB1A,* P58 e P1142 e o cruzamento 09D-0077 (obtido entre a cultivar BR 16 e P58) sob deficiência hídrica em condições experimentais de casa de vegetação e campo. Molecularmente, a expressão dos genes ativados pela expressão basal do promotor estresse induzido *rd29A* em condições de boa disponibilidade hídrica foi analisada por microarranjo de DNA. Para os genes identificados como diferencialmente expressos, uma busca por elementos *cis*-atuantes chaves na região promotora auxiliou na compreensão das possíveis

vias metabólicas ativadas em resposta a seca e dos mecanismos de manutenção celular em plantas de soja.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Caracterização molecular, fisiológica e agronômica de linhagens de soja geneticamente modificada com a construção *rd29A*:*At*DREB1A em condições de casa de vegetação e campo.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a tolerância à desidratação através da expressão do fator de transcrição *At*DREB1A em plantas de soja;
- Analisar o desempenho agronômico e fisiológico das plantas geneticamente modificadas (GMs) de soja contendo a construção *rd29A*:*At*DREB1A em condições de campo e em casa de vegetação;
- Identificar genes potencialmente regulados pelo fator de transcrição *At*DREB1A, em linhagens de soja GMs em condições de boa disponibilidade hídrica;
- Analisar região promotora de genes regulados por *At*DREB1A visando identificar, o elemento *cis*-atuante DRE.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Mecanismos fisiológicos e bioquímicos de resposta ao déficit hídrico com ênfase em plantas expressando o fator de transcrição DREB1A.

O déficit hídrico pode ser definido como a redução de água de um determinado tecido ou célula, que os coloca abaixo do conteúdo necessário para a manutenção das funções biológicas que ocorrem no estado de maior hidratação (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Na cultura da soja, o déficit hídrico causa queda prematura de folhas e flores e abortamento de vagens, resultando em redução no rendimento de grãos. Desclaux et al. (2000) também reportaram que o estresse hídrico pode conduzir a uma mudança precoce do desenvolvimento vegetativo para o reprodutivo, menor número de nós, antecipação da formação de flores e vagens e a um encurtamento da fase reprodutiva, acarretando em diminuição do período de enchimento de grãos. Os efeitos da deficiência hídrica na soja, assim como em outras culturas/plantas dependem, entretanto, da época de ocorrência, da severidade, do genótipo e do estádio de desenvolvimento vegetal.

As respostas iniciais das plantas ao déficit hídrico ocorrem no sentido de prevenir o declínio do conteúdo de água dos tecidos pela manutenção do balanço entre taxa de perda e taxa de absorção (VERSLUES et al., 2006), sendo este tipo de resposta classificada como evite à seca. Esse tipo de estratégia atua no sentido de manter o Ψ (potencial hídrico) do tecido próximo aos níveis de plantas não estressadas o que é normalmente conseguido, em curto prazo, por meio de fechamento estomático. Embora inicialmente o fechamento estomático propicie um equilíbrio no Ψ da planta e solo, ele causa em contrapartida uma diminuição na atividade fotossintética, em decorrência da redução na concentração intercelular de CO_2. Há nessas situações um conflito entre a conservação da água pela planta e a taxa de assimilação de CO_2 para produção de carboidratos (SANTOS & CARLESSO, 1998).

Assim, à medida que o déficit hídrico persiste, outras mudanças são observadas nas plantas, tais como o aprofundamento de raízes, aumento da proporção de tecidos condutores, emissão rápida de raízes novas, ajustamento osmótico, enrolamento de folhas, redução da área foliar, abscisão foliar, aumento de tricomas, entre outros.

O ajustamento osmótico pode ser definido como o aumento líquido nos solutos compatíveis os quais são capazes de baixar o Ψ foliar e permitir a manutenção, até certos níveis, da absorção de água do solo. Tais solutos podem ser inorgânicos, principalmente K+ e

Cl-, ou orgânicos, como a prolina ou glicina betaína e carboidratos como sucrose, trehalose, pinitol, sorbitol ou manitol.

À medida que o Ψ do solo continua a decrescer e as plantas não podem mais evitar a desidratação, mecanismos de tolerância tornarão-se críticos para sua sobrevivência (SUNKAR, 2010). A desidratação altera o metabolismo celular e células tolerantes devem ter a habilidade de regular os processos metabólicos desencadeados pelo déficit hídrico, ou reparar os danos do mecanismo não regulado (PAMMENTER et al., 2002; WALTERS et al., 2002). Produtos do metabolismo não controlado, em particular, espécies reativas de oxigênio (ERO), tem sido implicados como agentes causais dos danos celulares (LEPRINCE et al., 1990, APEL et al., 2004).

Mecanismos de tolerância podem ser vistos então, como aqueles que atuam no controle do nível de espécies reativas de oxigênio, como superóxido O_2-, peróxido de hidrogênio H_2O_2, radical hidroxila OH−, entre outros. e na limitação e/ou no reparo dos danos causados pelos ERO. Exemplos são os componentes enzimáticos de detoxificação tais como as enzimas glutationaredutase-GR, superóxido dismutase- SOD, catalases-CAT, peroxidades: (APX/GPX) e não enzimáticos como a glutationa, o ascorbato e o tocoferol. Proteínas LEA (*Late Embriogenesis Abundant*), por exemplo, parecem funcionar como chaperonas, pois sequestram íons, estabilizam proteínas, membranas e cromatina e renaturam proteínas (VERSLUES et al., 2006).

Além de participar do ajuste osmótico, alguns solutos também promovem a detoxificação de espécies de oxigênio reativo, fazendo também parte das estratégias de tolerância à seca. Dentro deste grupo de solutos compatíveis, a trehalose é um dos mais efetivos osmoreguladores em termos de concentrações mínimas requeridas (INGRAN e BARTELS, 1996). Este carboidrato funciona estabilizando membranas, proteínas e enzimas desidratadas e protegendo estruturas biológicas de danos durante a dessecação (GARG et al., 2002). A prolina é outro osmoprotetor que atua na estabilização de estruturas celulares e na eliminação de radicais livres (HONG et al., 2000).

As respostas das plantas às condições diferenciadas de estresses e na combinação destes demonstram a plasticidade do genoma vegetal em responder às mudanças ambientais, e esta plasticidade é dada pela grande rede de fatores de transcrição que respondem às condições às quais as plantas são constantemente submetidas (RIZHSKY et al., 2002).

Devido ao papel central dos fatores de transcrição DREBs/CBFs nas respostas aos estresses abióticos e sua habilidade em regular um grande número de genes responsivos ao

estresse, eles se tornaram alvos frequentes da engenharia genética visando aumentar a tolerância a estresses abióticos em várias espécies (LOPATO e LANGRIDGE, 2011).

Resultados de experimentos com o gene DREB em trigo (PELLEGRINESCHI et al., 2004; GAO et al., 2009) e outras culturas tais como, tabaco (KASUGA et al., 2004), arroz (DUBOUZET et al., 2003), milho (QIN et al., 2004), amendoim (BHATNAGAR- MATHUR et al., 2004) e soja (LI et al., 2005) mostraram maior sobrevivência e recuperação das plantas transgênicas após déficit hídrico severo. Mais recentemente foi demonstrado que a superexpressão constitutiva de dois fatores de transcrição DREB de trigo em cevada aumentou substancialmente a sobrevivência das plantas transformadas sob seca severa e frio (MORRAN et al., 2010).

Polizel et al. (2011) mostraram que soja superexpressando o gene *At*DREB1A apresentou retardo na senescência e após estresse severo (2,5% de umidade gravimétrica) manteve valores mais altos de fotossíntese líquida e eficiência fotossintética.

Na literatura, tem sido sugerido que a melhor sobrevivência após estresse severo de plantas geneticamente modificadas em relação ao controle podem estar associadas com a ativação de genes relacionados à tolerância à seca ou devido a uma redução no consumo de água resultante de menor tamanho das plantas, isto é, um padrão de crescimento conservativo das transgênicas quando comparado com os controles (BHATNAGAR- MATHUR et al., 2004; MORRAN et al., 2010; SAINT PIERRE et al., 2012).

Bhatnagar-Mathur et al. (2007) e Devi et al. (2011) mostraram entretanto, que eventos transgênicos de amendoim transformados com *rd29A: At*DREB1A tiveram uma aumentada eficiência de transpiração em relação ao controle não transformado.

Bhatnagar-Mathur (2006) trabalhando com plantas de amendoim sugeriram que a superexpressão do fator de transcrição DREB1A parece conferir capacidade de economia de água nas plantas transgênicas quando comparada com seu parental não transformado. Vários eventos transgênicos pareceram ter consistentemente maior eficiência de transpiração do que o tipo selvagem em diferentes regimes hídricos. Os autores também sugeriram que sob condições bem irrigadas a maior eficiência de transpiração das plantas transformadas estava associada a menor condutância estomática (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2007). Sob déficit hídrico apenas um dos eventos selecionados teve eficiência de transpiração 40% maior do que o controle não transformado.

A razão entre a taxa de transpiração e o ganho de matéria seca ao longo do período de déficit hídrico resulta na eficiência de transpiração (ET). A ET tem sido relacionada à eficiência de uso da água (EUA) por meio da fórmula: EUA (biomassa) =TE/ $(1+E_s/T)$

proposta por Richards (1991) onde E_S é a perda de água por evaporação da superfície do solo e T é a água perdida por meio da transpiração. Nos experimentos em casa de vegetação onde os vasos são colocados dentro de sacolas plásticas para prevenir evaporação do solo a TE=EUA.

Em seus trabalhos Vadez et al. (2007) observaram grande modificação no relação raiz/parte aérea das plantas transgênicas sob déficit hídrico e sugeriram que a melhor eficiência no uso de água de plantas DREB1A estava relacionada com características de crescimento do sistema radicular.

Mais recentemente Vadez et al. (2013) verificaram que os eventos transgênicos DREB1A de *Arachis hypogaea L.*, RD2, RD11 e RD33 tiveram maior extração de água sob déficit hídrico do que o controle não transformado. Contudo em condições bem irrigadas, RD33 também teve maior extração de água do que o controle embora o RD11 tenha tido menor extração de água. O autor concluiu que o estresse hídrico promoveu crescimento de raízes nos eventos transgênicos mais do que no tipo selvagem e especialmente nas camadas mais profundas do solo. Isso levou à maior extração de água nos três eventos transgênicos quando comparados ao tipo selvagem sob condições de déficit hídrico e foi relacionado com diferenças na extração de água nas 3 semanas seguintes à imposição hídrica.

De acordo com Passioura et al. 2012 embora a sobrevivência sob estresse hídrico seja importante para produção comercial de algumas culturas, como por exemplo, pastagens perenes em ambientes áridos ou semi-áridos, ela é irrelevante para culturas que produzem grãos, pois se a seca for tão severa a ponto de afetar a sobrevivência da cultura então a produtividade será desastrosamente baixa independente se a cultura sobreviver ou não.

Assim para assegurar estabilidade na produção de alimentos para população humana crescente nos próximos 20-50 anos será necessário o conhecimento das plantas geneticamente modificadas quanto a sua eficiência na assimilação de carbono, biomassa total, produtividade, conservação de água e eficiência de uso de água. Claramente, análises mais profundas do metabolismo e fisiologia das plantas geneticamente modificadas serão necessárias para auxiliar a tecnologia de engenharia genética e melhorar a produtividade das plantas em ambientes secos (LAWLOR, 2013).

3.2 Análise da expressão gênica

A genômica funcional, que inclui transcriptômica, proteômica e metabolômica tem como objetivo determinar as funções biológicas dos genes para melhor compreender o

funcionamento dos organismos. O transcriptoma é o conjunto de transcritos de um organismo, órgão, em estádio específico do desenvolvimento ou tratamento e compreende-lo é essencial para a interpretação dos elementos funcionais do genoma contidos em células e tecidos, e também para a compreensão de doenças e estresses bióticos e abióticos (WANG et al., 2009).

Nos últimos anos várias técnicas foram e estão sendo desenvolvidas com o objetivo de analisar global e/ou pontualmente a expressão gênica das espécies. Assim, a capacidade de medição simultânea da expressão de milhares de genes tornou-se um poderoso sistema analítico. A disponibilidade de novas tecnologias para este fim resultou em muitas estratégias para o estudo da resposta gênica (MITRA et al., 2003).

O pioneiro dos métodos atuais de análise de expressão gênica foi o *Northern blot*, uma técnica em que uma sonda marcada é hibridizada com um RNA alvo, e a intensidade do sinal resultante quantifica a expressão do gene de interesse (MEYERS et al., 2004; HOHEISEL, 2006). Atualmente, a metodologia de PCR em tempo real ou PCR quantitativo (RT - qPCR) apresenta-se como a técnica mais precisa para quantificar níveis de expressão de um determinado gene, com dados rápidos e reprodutíveis (GINZINGER, 2002). O qPCR possibilita o monitoramento ciclo a ciclo na reação de amplificação e a quantificação é realizada durante a fase exponencial pela detecção da intensidade de fluorescência emitida pelos fluoróforos (NOVAIS et al., 2004). O *cycle threshold* ou Ct determina o ciclo em que cada amostra emitiu fluorescência suficiente para ser detectada e é inversamente proporcional à quantidade inicial do alvo presente na reação. Este valor é então considerado para a quantificação da expressão gênica relativa ou absoluta pelo PCR quantitativo (KUBISTA et al., 2006).

Em um âmbito não tão específico e pontual, os microarranjos de DNA foram uma inovação na análise de expressão gênica; método capaz de analisar simultaneamente o nível de expressão de milhares de genes. Essa técnica tem sido maciçamente utilizada para investigar transcriptomas vegetais para responder várias questões biológicas envolvendo tolerância a estresses bióticos e abióticos (ÖKTEM et al., 2008) em *Arabidopsis thaliana* (SEKI et al., 2001; MARUYAMA et al., 2004; MARUYAMA et al., 2012), arroz (ITO et al., 2006; MARUYAMA et al., 2012) e soja (MARUYAMA et al., 2004; MARUYAMA et al., 2012), entre outras espécies. De modo geral, os microarranjos podem ser compostos de oligonucleotídeos, fragmentos de DNA genômico ou clones de cDNA e nesta metodologia, a hibridização do cDNA ou DNA genômico alvo com sondas marcadas pela incorporação de nucleotídeos fluorescentes, revela os níveis dos transcritos expressos (HALL et al., 2000; SCHENA, 1995). Embora amplamente utilizada, essa tecnologia preconiza a manutenção e

manipulação das lâminas, além da validação dos clones e reações de PCR em larga escala (CLOSE et al., 2004). Dentre outras aplicações, os microarranjos podem ser utilizados ainda na detecção de polimorfismos, análise de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), re-sequenciamento e genotipagem (HACIA, 1999; HOHEISEL, 2006).

Com o avanço nos conhecimentos genômicos, outras técnicas para a análise simultânea de milhares de genes surgiram como os ESTs (*Expression Sequence Tags* – Etiquetas de sequências expressas), o SAGE (*Serial Analysis for Gene Expression* – Análise serial da expressão gênica) ou MPSS (*Massively Parallel Signature Sequencing*). Estas metodologias não exigem o conhecimento prévio das sequências dos transcritos, favorecendo muitas vezes a identificação de transcritos ainda desconhecidos ou que não foram identificados/quantificados (NIELSEN et al., 2003).

Mais recentemente, com o desenvolvimento de novos processos de sequenciamento de DNA, um novo método para mapeamento e quantificação de transcriptomas despontou. O RNA-Seq (sequenciamento de RNA) apresenta vantagens claras sobre abordagens existentes e já foi aplicada em organismos modelo como *Arabidopsis thaliana* (CLOONAN et al., 2008; LISTER et al., 2008; MARIONI et al., 2008) e espécies de interesse econômico. O RNA-Seq consiste em um sequenciamento detalhado do cDNA onde, uma população formada de RNA (total ou fragmentado) é convertido em uma biblioteca de fragmentos de cDNA ligados a adaptadores. Cada molécula, com ou sem amplificação prévia, é então sequenciada para se obter um alto rendimento de sequências curtas de uma extremidade ou ambas as extremidades. As leituras são tipicamente feitas com 30-400 pb, dependendo da plataforma de sequenciamento utilizada. Em princípio, qualquer uma das plataformas da nova geração de sequenciamento pode ser utilizada como Illumina IG (MARIONI et al., 2008; CLOONAN et al., 2008; LISTER et al., 2008), SOLiD da Applied Biosystems e 454 da Roche (CLOONAN et al., 2008).

3.2.1 Regulação gênica e os fatores de transcrição estresse responsivos

Decifrar os mecanismos pelo qual as plantas percebem sinais do ambiente e de como ocorre essa transmissão para a maquinaria celular, ativando respostas de adaptação é de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias para produção de plantas geneticamente modificadas mais tolerantes a estresses abióticos (HUSSAIN et al., 2011).

Os estresses abióticos são de fato estímulos complexos, que derivam uma multiplicidade de sinalização celular, resultando na indução da ativação de vários genes

responsivos que desencadeiam respostas moleculares, celulares e fisiológicas ao estresse. A sequência de resposta inclui assim processos de percepção, transdução de sinal para o citoplasma e núcleo, expressão de genes, e finalmente, as alterações metabólicas que levam à tolerância (SHINOZAKI e YAMAGUICHI-SHINOZAKI, 2006; XU et al., 2011).

As vias vegetais reguladoras de resposta aos estresses abióticos são tradicionalmente classificadas em ABA-dependente e ABA-independente (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000) (Fig. 1). O fitohormônio ácido abscísico (ABA) desempenha um papel importante na adaptação dos tecidos vegetativos a estresses abióticos, particularmente a seca. Quando submetidas a condições de deficiência hídrica, a percepção nas raízes das plantas do ressecamento do solo promove um acúmulo de ABA, que é redistribuído aos tecidos da planta via xilema, como um sinalizador químico para o fechamento dos estômatos. Este mecanismo contribui para manter um alto conteúdo de água na folha e um elevado potencial de água, mas em contrapartida provoca uma diminuição na atividade fotossintética, reduzindo nas folhas, a concentração intercelular e impondo limitações na assimilação de CO_2 (FREDERICK et al., 1989; LIU et al., 2005). Isto provoca um desequilíbrio entre a atividade fotoquímica do fotossistema II (PS II) e a exigência de elétrons para o processo fotossintético (HE et al., 1995, FLAGELLA et al., 1998). Segundo Wittenmayer e Merbach (2005) os efeito do ABA e do déficit hídrico são similares, de modo que, o fechamento estomático pode ocorrer devido a sinais hidráulicos (potencial de água na folha e turgor celular) e/ou sinais químicos (hormônio ácido abscísico – ABA), no entanto, a maioria das pesquisas sugere uma combinação de sinalização que podem ocorrer juntas ou em tempos diferentes (KALEFETOĞLU e EKMEKÇI, 2005; COMSTOCK, 2002).

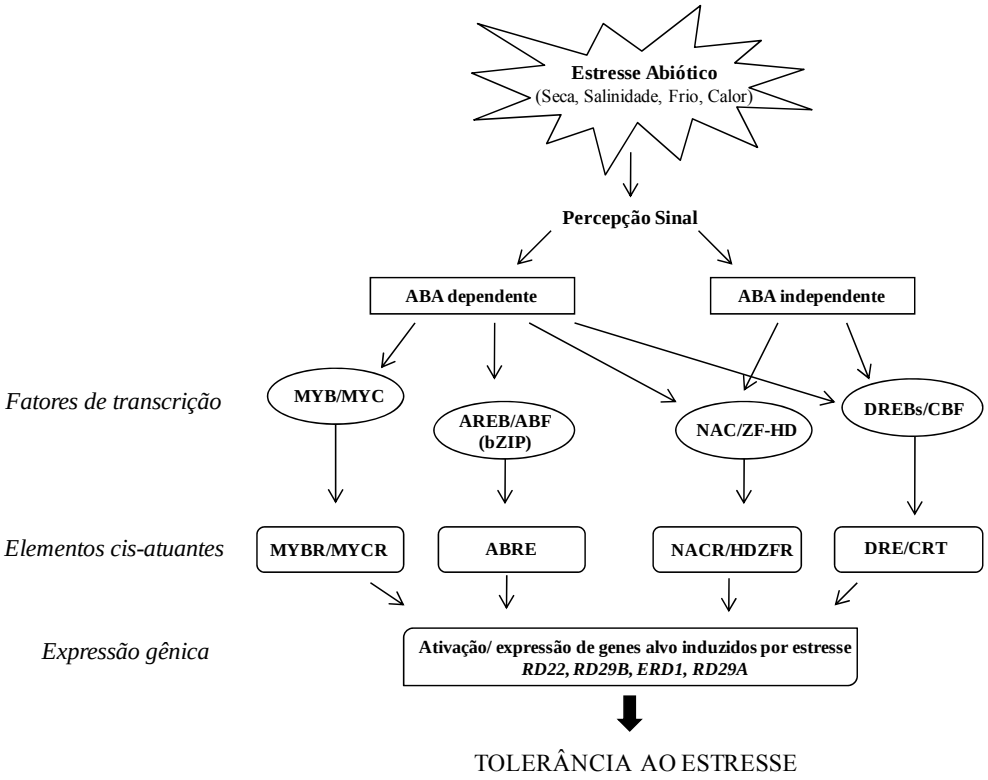


Fig. 1: Redes de regulação transcricional dos sinais de estresse abiótico e expressão gênica. Representação esquemática da regulação transcricional dos elementos *cis*-atuantes e dos fatores de transcrição envolvidos em resposta a estresses abióticos. Adaptado de Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki (2007).

Quanto aos genes ativados por estas vias de respostas, análises do transcriptoma de *Arabidopsis thaliana* utilizando a tecnologia de microarranjos (SEKI et al., 2001), revelaram que os genes estresse induzidos podem ser categorizados em dois grupos de acordo com suas funções do seus produtos (SHINOZAKI et al., 2003). O primeiro grupo consiste em proteínas funcionais, tais como, proteínas de membrana que mantém a circulação de água através de membranas (proteínas de canal de água e membrana transportadores); enzimas essenciais para a biossíntese de osmólitos (prolina, betaína e de açúcares, etc) e outras proteínas para proteção de macromoléculas (como proteínas LEA, osmotina, proteínas anticongelantes). O segundo grupo compreende proteínas reguladoras, ou seja, os chamados fatores de transcrição, as proteínas quinases e proteinases envolvidas na regulação da transdução sinal e na expressão de genes (SHINOZAKI et al., 2003) (Fig. 1). Dentre estes genes estresse responsivos, os fatores de transcrição são ferramentas poderosas para a engenharia genética, pois controlam/regulam a expressão de vários outros genes responsáveis por alterações e mudanças metabólicas e fisiológicas que resultam na tolerância (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006).

Vários fatores de transcrição como *ABF, bZIP, WLIP, MYB, MYC, ANAC, NAC, SNAC, CBF, BNCBF, DREB1, DREB2, AREB,* têm sido estudados na planta modelo *Arabidopsis thaliana* e também em culturas de interesse econômico como, arroz, milho e soja. De acordo com a literatura científica, esses fatores são apontados como genes potenciais no aumento da tolerância aos diferentes estresses ambientais como a seca, frio e alta salinidade, sendo os produtos oriundos destes trabalhos considerados a terceira geração de sucesso da biotecnologia (SCHWECHHEIMER et al., 1998; SINGH et al., 2002; AGARWAL & JHA, 2010).

Os FTs AREB/ABFs (*ABA Responsive Element Binding/ABA binding*) são proteína do tipo bZIP responsáveis por controlar a expressão de genes de resposta ao ABA no estádio vegetativo e a estresses abióticos (FUJITA et al., 2011). Estes FTs se ligam ao elemento *cis* - atuante (C/T ACGTGGC) ABRE (*ABA Responsive Element* – elemento responsivo ao ABA) presente na região promotora dos genes alvos, ativando e regulando a transcrição (FINKELSTEIN et al., 2002; FUJITA et al., 2005; FURIHATA et al., 2006, YOSHIDA et al., 2010). A sequência ABRE foi identificada pela primeira vez no gene de trigo *Em* ativado, principalmente, em sementes durante a embriogênese tardia (GUILTINAN et al., 1990), e em arroz, no gene *RAB16*, expresso em condições de deficiência hídrica, em tecidos vegetativos e na germinação de sementes (MUNDY et al., 1990). Uma única cópia da sequência ABRE não é suficiente para a transcrição de genes responsivos ao ABA (GUILTINAN et al., 1990; SKIVER et al., 1991; SHEN et al., 1996), sendo necessária no mínimo a presença de dois *motifs*. Vários estudos têm sugerido a função ABRE/ABFs nas vias de resposta a diferentes estresses, como *ABF1* no frio; *ABF2* em salinidade, seca, calor e glicose; *ABF3* em salinidade; *ABF4* no frio, na salinidade e nas vias de sinalização de seca (KIM et al., 2005.; FUJITA et al., 2005). *AREB1*/*ABF2*, *AREB2/ABF4* e *ABF3* foram expressos em tecidos vegetativos, enquanto *ABI5* e *EEL* foram expressos durante a maturação da semente e/ou germinação (CHOI et al., 2000; UNO et al., 2000; FUJITA et al., 2005;. NAKASHIMA & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006).

No contexto de utilização dos FTs *AREB* para aumento de tolerância a estresses abióticos, a expressão constitutiva dos fatores de transcrição *ABF3* e *ABF4*, aumentou a tolerância à seca em plantas de *Arabidopsis thaliana*, com expressão alterada de genes de resposta ao ABA, tais como *rd29B, rab18, ABI1* e *ABI2* (KANG et al., 2002). Em soja, a expressão de *AREB1A* sob o controle do promotor CaMV35S, resultou em linhagens com tolerância aumentada, sobrevivendo a 05 dias sem irrigação e exibindo pouco dano foliar. Estas linhagens exibiram ainda maior condutância estomática e fotossíntese, confirmando o

potencial deste FT no incremento da tolerância a seca (BARBOSA et al., 2012). Em arroz, a expressão de *OsABI5* foi ativada por ABA e alta salinidade, mas foi regulada pela seca e frio em mudas, e sua superexpressão também aumentou a tolerância à salinidade (ZOU et al., 2008; NAKASHIMA at al., 2009). Tolerância a seca e calor também foi observada quando a construção *35S:OsAREB1* foi inserida em *Arabidopsis thaliana* (JIN et al., 2010).

Ainda dentre os membros das família dos FTs bZIP, no genoma da soja, 176 fatores de transcrição bZIPs já foram identificados e nomeados como GmbZIPs, mas somente 05 estão caracterizados de acordo com Schmutz et al. (2010). Os fatores de transcrição bZIPs, *GmbZIP44*, *GmbZIP62* e *GmbZIP78*, pertencem aos subgrupos S, C e G, respectivamente, e funcionam como reguladores negativos na sinalização ABA, conferindo tolerância à salinidade e ao frio em plantas de *Arabidopsis thaliana* transgênicas (LIAO et al., 2008a). O quarto fator de transcrição isolado, foi o *GmbZIP132*, induzido por tratamentos de seca e alta concentração salina, podendo estar mais relacionado à dormência de sementes, uma vez que, uma maior expressão gênica deste fator foi detectada em cotilédones por LIAO et al., (2008b). Em 2011, Gao et al. isolaram um quinto e novo fator bZIP nomeado *GmbZIP1*. Análises funcionais mostraram que plantas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando *GmbZIP1* ativaram o fechamento estomático e diminuíram a perda de água não somente sob estresse hídrico, mas também, sob condições de estresse com ABA e sal. Filogeneticamente, *GmbZIP1* é um ortólogo muito próximo de *AtAREB1*/*AtABF2*, um FT bZIP de *Arabidopsis thaliana* pertencente ao grupo A. Em arroz, a super expressão do gene *OsbZIP23* melhorou significativamente a tolerância à seca e à alta salinidade em plantas geneticamente modificadas no estádio reprodutivo (XIANG et al., 2008). Também, em plântulas de milho, *ZmbZIP17* foi regulado por seca, calor, ABA e estresse salino (JIA et al., 2009).

A família de FTs NAC (NAC, NAM, ATAF1-2 e CUC2), também envolvida na resposta a vários estresses ambientais, é uma das maiores de FTs presentes no genoma das plantas, sendo mais de 100 membros identificados em *Arabidopsis thaliana* e arroz (FANG et al., 2008). O elemento *cis*-atuante do FT NAC (CACG) foi inicialmente identificado em *Arabidopsis thaliana* (TRAN et al., 2004). Em *A. thaliana* ainda, genes como ANAC019, ANAC055 e ANAC072 foram identificados em resposta a estresses abióticos (TRAN et al., 2004). Hu et al. (2006) trabalhando com o gene *SNAC1* em arroz, identificou um aumento da expressão em condições de seca e alta salinidade, com expressão predominante em células-guarda, resultando em plantas mais tolerantes a estes estresses. Em soja, 101 proteínas contendo o domínio NAC foram identificadas como envolvidas na resposta a estresses abióticos e em eventos de morte celular programada. Os genes *GmNAC2*, *GmNAC3* e

GmNAC4 foram fortemente induzidos por estresse osmótico (PINHEIRO et al., 2009). Em raízes de soja submetidas à seca, o gene *NAC6* apresentou aumento no nível de expressão (PEREIRA et al., 2011). Em arroz, Nakashima et al. (2007) superexpressandoo gene *Os*NAC6, membro da família NAC, descreveu 33 genes induzidos por desidratação com altos níveis de expressão. Foram encontrados dentre esses genes 54 FTs contendo o domínio MYB, o que corrobora com a teoria de He et al. (2005), que propõe a interação entre membros das famílias NAC e MYB em respostas vegetais a estresses abióticos. Ainda, plantas de arroz superexpressando *ONAC045* demostraram maior tolerância à seca e salinidade (ZHENG et al., 2009). Todos estes trabalhos sugerem que os FTs NAC desempenham um papel importante na tolerância a estresse abióticos (HU et al., 2006, 2008; NAKASHIMA et al., 2007).

Os FTs MYB/MYC desempenham papéis importantes em muitos processos fisiológicos vegetais, em condições normais ou desfavoráveis ao crescimento (JIN e MARTIN, 1999; CHEN et al., 2006). Eles também estão envolvidos no metabolismo secundário (PAZ-ARES et al., 1987), formação de meristema floral e desenvolvimento de sementes (KIRIK et al., 1998), no controle do ciclo celular (ARAKI et al., 2004) e na defesa e respostas a estresses abióticos (ABE et al., 2003). Trabalhos ilustram a função destes FTs em resposta a estresses abióticos. Os genes *At*MYB2 e *At*MYC2 apresentam função cooperativa de transcrição no processo de desidratação e tratamento com ABA induzindo a expressão do gene *rd22* (ABE et al, 2003). Também, os genes *At*MYB60 e *At*MYB44 estão envolvidos no movimento estomático atuando como um repressor transcricional em *Arabidopsis thaliana*, mas no entanto, sua expressão é regulada negativamente em células guarda durante períodos de seca (COMINELLI et al., 2005; JUNG et al., 2008). Em *Arabidopsis thaliana, At*MYB41 é transcricionalmente regulado em resposta à seca, alta salinidade, frio e a ABA (LIPPOLD et al., 2009). Ainda nesta planta modelo, a super expressão de *MYB15* resultou na tolerância a seca e alta salinidade (DING et al., 2009). Em soja, o FT *MYBJ7* apresentou um alto nível de expressão em raízes submetidas ao déficit hídrico (PEREIRA et al., 2011).

Outros FTs envolvidos em resposta a estresses bióticos e abióticos são as proteínas WRKY exclusivas de plantas (DONG et al., 2003). Em *Arabidopsis thaliana* foram identificados 74 membros desempenhando múltiplas funções (FOWLER e THOMASHOW, 2000; SEKI et al., 2002; MARE et al., 2004) em vários processos fisiológicos, incluindo senescência, desenvolvimento de tricomas e biossíntese de metabólitos secundários (EULGEM et al., 2000). Trabalhos mostram que a expressão de *OsWRKY45* em arroz foi regulada por seca, calor, frio e salinidade (QIU & YU, 2009). Em *Arabidopsis thaliana,* o

gene *OsWRKY45* foi super expresso conferindo tolerância à seca. Os autores sugerem que o gene *OsWRKY45* pode estar envolvido na síntese de ABA induzindo uma cascata de sinalização que fisiologicamente reduz a transpiração, resultando em uma maior tolerância à seca (QIU & YU, 2009). Em soja, os genes *GmWRKY13*, *GmWRKY21* e *GmWRKY54* foram considerados diferencialmente expressos sob estresse abiótico (Zhou et al., 2008).

3.2.2 Fator de transcrição DREB

O fator de transcrição (FT) DREB (*Dehydration Responsive Element Binding*) ou CBF (*C-repeat binding factor*) induz em condições de estresses abióticos, um conjunto de genes relacionados, resultando na tolerância vegetal. Estes FTs pertencem a subfamília de proteínas APETALA2 (AP2)/ERF (*APETALA 2/ethylene-responsive element binding fator*) e se ligam ao elemento *cis*-atuante DRE/CRT (*C-repeat/dehydration-responsive element* - elemento responsivo a desidratação/C-repeat) presente no promotor de genes ativando, regulando e modulando sua expressão, e conferindo tolerância a estresses abióticos como seca, frio e alta salinidade (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2006; SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; XU et al., 2008; NAKASHIMA et al., 2009; WANG et al., 2011; MIZOI et al., 2012).

Vários genes estresse induzidos por desidratação contém esta sequência conservada DRE de 9 pb (TACCGACAT) na região promotora (LIU et al., 1998; STOCKINGER et al., 1997). Este elemento *cis*-atuante foi primeiramente identificado na região promotora do gene de resposta a desidratação *rd29A* (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 1993). O elemento DRE é essencial para a indução da expressão do gene *rd29A*, em respostas a estresses abióticos como seca, alta salinidade e frio, mas não ABA (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 1994). A região DRE com o *motif* central conhecido A/CCGAC foi identificada na região promotora de muitos genes estresse induzidos em várias plantas como *Arabidopsis thaliana* e arroz (NAKASHIMA et al., 2009). Ao contrário de ABRE, uma única cópia de DRE é suficiente ativar a expressão de genes estresse responsivos atuando de forma ABA-independente, o que sugere que DRE não requer outros elementos para a indução da expressão gênica (YAMAGUICHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 1994).

A introdução do FT *DREB1A* em plantas de diversas culturas utilizando diferentes promotores resultou em uma maior tolerância a seca. Em *Arabidopsis thaliana* a expressão de *DREB1A* e *DREB1B* sob controle do promotor constitutivo CaMV 35S resultou em aumentada tolerância a seca, frio e a alta salinidade sugerindo que DREBs controlam

múltiplos genes estresse induzidos (JAGLO-OTTOSEN et al., 1998; LIU et al., 1998; KASUGA et al., 1999). A superexpressão de *DREB1A* aumentou a tolerância seca e ao frio em tabaco (KASUGA et al., 2004). Plantas de trigo transgênicas contendo o gene *AtDREB1A* dirigido pelo promotor *rd29A* apresentaram tolerância ao estresse hídrico quando comparadas às plantas não transgênicas submetidas ao déficit hídrico em casa de vegetação (PELLEGRINESCHI et al., 2004). Bhatnagar-Mathur et al. (2007, 2009) trabalhando com amendoim transformado com a construção gênica *rd29A:DREB1A* verificaram maior eficiência de transpiração e acúmulo elevado de algumas das principais enzimas antioxidantes e prolina, sob estresse hídrico. A superexpressão de *DREB1A* em plantas de arroz resultou em maior tolerância à seca e a alta salinidade (OH et al., 2005). Também Ito et al. (2006) trabalhando com arroz, observaram que a super expressão de *DREB1A* promoveu tolerância a seca, salinidade e ao frio provocando o acúmulo de osmoprotetores como prolina e vários de tipos de açúcares. Em 2012, Polizel et al. observaram uma maior expressão de *DREB1A* em plantas de soja com aumento na tolerância a seca (POLIZEL et al., 2011). Em crisântemo, *At*DREB1A heterólogo sob o controle do promotor *rd29A* conferiu tolerância à seca e salinidade, e essa melhoria da tolerância pode estar relacionada ao aumento do teor de prolina (HONG et al., 2006).

Ainda, a expressão de *DREB2A* de *Arabidopsis thaliana* e seu homólogo *DREB2B* foi induzida por salinidade e desidratação, mas não por frio e ABA (LIU et al, 1998, NAKASHIMA et al., 2000). Da mesma forma, ABA, manitol e tratamentos a frio tiveram um efeito mínimo na expressão *DREB2C* (LEE et al., 2010). A superexpressão do gene *OsDREB2B,* de arroz em *Arabidopsis thaliana* resultou em maior expressão de *DREB2A* conferindo tolerância a seca e ao choque térmico (MATSUKURA et al., 2010).

Estes estudos indicam que os FT DREB são importantes na regulação de genes relacionados aos estresses abióticos e desempenham um papel fundamental na tolerância em plantas (LATA et al., 2011).

3.2.3 Utilização do promotor rd29A no desenvolvimento de plantas GMs

Estresses abióticos podem ocasionar problemas no crescimento e desenvolvimento vegetal. Plantas geneticamente modificadas (PGMs) com genes chaves nas vias de repostas a estresse abióticos podem minimizar essas perdas econômico/financeiras e de produtividade. Estudos focados no desenvolvimento de plantas GMs devem considerar a escolha de promotor a ser utilizado na construção de interesse, analisando para isto a regulação da

expressão do transgene, a especificidade tecidual da expressão e o nível de expressão desejado (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2007). Neste sentido, a possibilidade de se utilizar promotores estresse induzidos que não afetam o crescimento vegetal ou que expressem em tecidos específicos abre novas alternativas na obtenção das PGMs envolvendo as vias de resposta responsáveis pela adaptação das plantas às condições ambientais adversas (BAJAJ et al., 1999). Os promotores constitutivos mais amplamente utilizados incluem o CaMV 35S, ubiquitina e actina. Estes promotores induzem a expressão de genes continuadamente, durante todo do ciclo de vida das plantas e em todos os tecidos vegetais. De modo geral, em condições normais crescimento, as plantas transformadas com genes estresse induzidos sob o controle do promotor CaMV 35S exibem alguns fenótipos indesejáveis, tais como retardo no crescimento e ananismo (KASUGA et al., 1999).

O fato do promotor *rd29A* ser ativado somente durante o estresse torna-o uma ferramenta interessante e estratégica no desenvolvimento de plantas GMs quando se busca uma resposta específica e apropriada que confere especificamente capacidade de adaptação em condições de estresse, além de evitar o alto custo energético associado com a produção de proteínas e tolerância ao estresse quando estas não são necessárias (RIERA et al., 2005; RAI et al., 2009). Para melhorar a tolerância das plantas à seca, ao frio e a alta salinidade, construções contendo genes específicos sob o controle do promotor estresse induzido *rd29A* já foram introduzidas em plantas modelo, e em culturas economicamente importantes como batata (BEHNAM et al., 2007), amendoim (BHATNAGAR- MATHUR et al., 2007), tabaco (LI et al., 2009), alfalfa (JIN et al., 2010; SUA'REZ et al., 2009), canola (WANG et al., 2005), trigo (HONG et al., 2006;. PELLEGRINESCHI et al., 2004), soja (POLIZEL et al., 2011) e em plantas ornamentais (DUBOUZET et al., 2003; ROY et al., 2008; MIRANDA et al., 2007). Em plantas de tabaco a utilização do promotor *rd29A* não só resultou em uma melhor tolerância ao estresse abiótico, mas também diminuiu os efeitos negativos no crescimento da planta (KASUGA et al., 2004).

3.3 Análise de Bioinformática

A bioinformática compreende o desenvolvimento de ferramentas e métodos computacionais para análise, manipulação, construção, edição e gerenciamento de dados biológicos (CRAVEN e SHAVLIK, 1994). É o campo da ciência onde a biologia, a ciência da computação e a tecnologia da informação se unem formando uma só disciplina, segundo o NCBI (Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia EUA – 2001).

Os objetivos da bioinformática são organizar os dados de uma forma que permita que todos tenham acesso aos dados existente, e que novas informações (sequências) possam ser depositadas em bancos de dados, sendo a acurácia das informações essencial para desenvolver ferramentas e recursos que auxiliem na análise dos dados e por fim, ousar essas ferramentas para analisar os dados e interpretar os resultados de forma biologicamente significativa (LUSCOMBE et al., 2001).

Atualmente, devido o grande volume de informações geradas pela biologia molecular, os bancos de dados são atualizados diariamente. Estes bancos são classificados de acordo com as informações biológicas podendo ser primário, secundário e especializado (XIONG, 2006). Os bancos primários compreendem informações armazenadas de sequências como de nucleotídeos e proteínas. Os secundários armazenam as análises realizadas a partir dos dados primários, como por exemplo, anotação, função, estrutura secundária e literatura associada. Os bancos de dados de biologia molecular especializados constituem pesquisas particulares, relacionado a um organismo específico como, por exemplo, Soybase (XIONG, 2006).

Nos últimos anos, o número dos bancos de dados *on-line* vem crescendo consideravelmente. Programas *on-line* como MEME (*Multiple EM for Motif Elicitation*) (BAILEY e ELKAN, 1994), Place, PlantCare podem ser utilizados para análise de *motifs* e elementos *cis*-regulatórios. O programa Genomatix além de fornecer informações sobre elementos *cis* regulatórios, disponibiliza ainda ferramentas de modelos e organização destes nas regiões promotoras. A análise dos elementos *cis*-atuantes presentes na região promotora dos genes fornece importantes informações sobre a rede gênica regulatória vegetal e também sobre a sobreposição destas vias metabólicas que controlam os processos biológicos, incluindo respostas a estresses abióticos, hormonais e processos de desenvolvimento.

4 REFERÊNCIAS

ABE, H.; ITO, T.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis thaliana AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. **Plant Cell**, v.5, p.63–78, 2003.

AGARWAL, P. K. & JHA, B. Transcription factors in plants and ABA-dependent and independent abiotic stress signalling. **Biologia Plantarum**, v.54, p.201-212, 2010.

APEL, K. & HURT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373–399, 2004.

ARAKI, S.; ITO, M.; SOYANO, T.; NISHIHAMA, R.; MACHIDA, Y. Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for trans activation of G2/M phase-specific genes in tobacco. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.32979–32988, 2004.

BAILEY, T. L. & ELKAN, C. The value of prior knowledge in discovering motifs with MEME++. Technical Report CS95- 413, Department of Computer Science, University of California, San Diego, 1995b.

BARBOSA, E. G. G.; LEITE, J. P.; MARIN, S. R. R.; MARINHO, J. P.; CARVALHO, J. F. C.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NAKASHIMA,K.; MARUYAMA, K.; KANAMORI, N.; FUJITA, Y.; YOSHIDA, T.; NEPOMUCENO, A. Overexpression of the ABA-Dependent AREB1 Transcription Factor from Arabidopsis thaliana Improves Soybean Tolerance to Water Deficit. **Plant Molecular Biology Reporter**, (doi 10.1007/s11105-012-0541-4), 2012.

BAJAJ, S.; TARGOLLI, J.; LIU, L-F.; HO, T-HD.; WU, R. Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. **Molecular Breeding**, v.5, n.6, p.493–503, 1999.

BEHNAM, B.; KIKUCHI, A.; CELEBI-TOPRAK, F.; KASUGA, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; WATANABE, K. N. Arabidopsis rd29A:DREB1A enhances freezing tolerance in transgenic potato. **Plant Cell Report**, v.26, n.8, p.1275–1282, 2007.

BHATNAGAR-MATHUR, P.; DEVI, M. J.; SERRA, J. R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; VADEZ, V.; SHARMA, K. K. Evaluation of transgenic groundnut lines under water limited conditions. **International Arachis Newsletter**, v.24, p.33–34, 2004.

BHATNAGAR-MATHUR, P. Studies on the development of abiotic stress tolerance in groundnut (Arachis hypogaea L.) by genetic transformation. 109 f. PhD thesis (Jawaharlal Nehru Technological University), p.109, 2006.

BHATNAGAR-MATHUR, D. S.; REDDY, M.; LAVANYA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHARMA, K. Stress-inducible expression of Arabidopsis thaliana DREB1A in transgenic peanut (Arachis hypogaea L.) increases transpiration efficiency under water-limiting conditions. **Plant Cell Report**, v.26, p.2071–2082, 2007.

CHEN, F.; LI, Q.; SUN, L.; HE, Z. The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress. **DNA Research**, v.13, p.53-63, 2006.

CHOI, H.; HONG, J.; HA, J.; KANG, J.; KIM, S. Y. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. **Journal Biological Chemistry**, v.275, p.1723-1730, 2000.

CLOSE, T. J. Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. **Plant Physiology**, v.97, p.795-803, 1996.

CLOONAN, N.; FORREST, A. R.; KOLLE, G.; GARDINER, B. B.; FAULKNER, G. J.; BROWN, M. K.; TAYLOR, D. F.; STEPTOE, A. L.; WANI, S.; BETHEL, G.; ROBERTSON, A.; PERKINS, A. J; BRUCE, S. J.; LEE, C. C.; RANADE, S. S.; PECKHAM, H. E.; MANNING, J. M.; MCKERNAN, K. J.; GRIMMOND, S. M. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. **Nature Methods**, v.5, p.613–619, 2008.

COMSTOCK, J. P. Hydraulic and chemical signaling in the control of stomatal conductance and transpiration. **Journal Experimental of Botany**, v.53, p.195-200, 2002.

COMINELLI, E.; GALBIATI, M.; VAVASSEUR, A.; CONTI, L.; SALA, T.; VUYLSTEKE, M.; LEONHARDT, N.; DELLAPORTA, S. L.; TONELLI, C. A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. **Current Biology**, v.15, p.1196–1200, 2005.

CRAVEN, M. & SHAVLIK, J. Understanding Time-Series Networks: A Case Study in Rule Extraction. International Journal of Neural Systems, v.8, p.373-384, 1997.

DESCLAUX, D.; HUYNH, T.; ROUMET, P. Identification of soybean plant characteristics that indicate the timing of drought stress. **Crop Science**, v.40, n.3, p.716-722, 2000.

DEVI, J. M.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; SHARMA, K. K.; SERRAJ, R.; ANWAR, S. Y.; VADEZ, V. Relationships between transpiration efficiency (TE) and its surrogate traits in the rd29A:DREB1A transgenic groundnut. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.197, p.272-283, 2011.

DING, Z.; LI, S.; AN, X.; QIN, H.; WANG, D. Transgenic expression of MYB15 confers e hanced sensitivity to abscisic acid and improved drought tolerance in Arabidopsis thaliana. Journal of Genetics e Genomics, v.36, p.17-29, 2009.

DONG, J.; CHEN, C.; CHEN, Z. Expression profiles of the Arabidopsis thaliana WRKY gene superfamily during plant defense response. **Plant Molecular Biology**, v.51, p.21–37, 2003.

DUBOUZET, J. G.; SAKUMA, Y.; ITO, Y.; KASUGA, M.; DUBOUZET, E. D.; MIURA, S.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Os-DREB genes in rice, Oryza sativa L.; encoded transcription activators that function in drought, high-salt and cold-responsive gene expression. **Plant Journal**, v.33, p.751-763, 2003.

FANG, Y.; YOU, J.; XIE, K.; XIE, W.; XIONG, L. Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. **Molecular Genetics and Genomics**, v.280, p.547–563, 2008.

FINKELSTEIN, R. R. & LYNCH, T. J. The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. **Plant Cell**, v.12, p.599–609, 2000.

FLAGELLA, Z.; CAMPANILE, R. G.; STOPPELLI, M. C.; DE CARO, A.; DI FONZO, N. Drought tolerance of photosynthetic electron transport under CO2-enriched and normal air in cereal species. **Physiologia Plantarum**, v.104, n. 4, p.753-759, 1998.

FREDERICK, J. R.; ALM, D. M.; HESKETH, J. D. Leaf photosynthetic rates, stomatal resistances, and internal CO2 concentrations of soybean cultivars under drought stress. **Photosynthetica**, v.23, p.575-584, 1989.

FOWLER, S.; THOMASHOW, M. F. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. **The Plant Cell**, v.14, p.1675–1690, 2000.

FURIHATA, T.; MARUYAMA, K.; FUJITA, Y.; UMEZAWA, T.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.103, n.6, p.1988-1993, 2006.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SATOH, R.; MARUYAMA, K.; PARVEZ, M. M.; SEKI, M.; HIRATSU, K.; OHME-TAKAGI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis thaliana. **Plant Cell**, v.17, p.3470–3488, 2005.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of Plant Research**, p.1-17, 2011.

GAO, S. Q.; CHEN, M.; XIA, L. Q.; XIU, H. J.; XU, Z. S.; LI, L.C.; ZHAO, C. P.; CHENG, X. G.; MA, Y. Z. A cotton (Gossypium hirsutum) DRE binding transcription factor gene, GhDREB, confers enhanced tolerance to drought, high salt, and freezing stresses in transgenic wheat. **Plant Cell Reports**, v.28, p.301–311, 2009.

GAO, S. Q.; CHEN, M.; XU, Z. S.; ZHAO, C. P.; LI, L.; XU, H. J.; TANG, Y. M.; Zhao, X.; MA, Y. Z. The soybean GmbZIP1 transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, v.75, n.6, p.37-53, 2011.
GARG, A. K.; KIM, J. K.; OWENS, T. G.; RANWALA, A. P.; CHOI, Y. C.; KOCHIAN, L. V.; WU, R. J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.99, p.15898–15903, 2002.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v.30, p.503 – 512, 2002.

GUILTINAN, M. J.; MARCOTTE, W. R.; QUATRANO, R. S. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. **Science**, v.250, p.267-271, 1990.

HACIA, J. G. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. Nature Genetics, v.21, p.42-47, 1999.

HALL, N. L. W.; VORST, O.; VAN HOUWELINGEN, A. M. M. L.; KOK, E. J.; PEIJNENBURG, A.; AHARONI, A.; VAN TUNEN, A. J.; KEIJER, J. The application of DNA microarray in gene expression analysis. **Journal of Biotechnology**, v.78, p.271-280, 2000.

HE, X. J.; MU, R. L.; CAO, W. H.; ZHANG, Z. G.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y. AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. **Plant Journal**, v.44, p.903–916, 2005.

HOHEISEL, J. D. Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. **Nature Publishing Group**, v.7, p.200-210, 2006.

HONG, B.; TONG, Z.; MA, N.; LI, J. K.; KASUGA, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; GAO, J. P. Heterologous expression of the AtDREB1A gene in chrysanthemum increases drought and salt stress tolerance. **Science in China Series C: Life Sciences**, v.49, p.436–445, 2006.

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

HUSSAIN, S. S.; KAYANI, M. A.; AMJAD, M. Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants. **Biotechnology Progress**, v.27, n. 2, p.297-306, 2011.

HU, H.; YOU, J.; FANG, Y.; ZHU, X.; QI, Z.; XIONG, L. Characterization of transcriptional factor gene NAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. **Plant Molecular Biology**, v.67, p.169-181, 2008.

HU, H.; DAI, M.; YAO, J.; XIAO, B.; LI, X.; ZHANG, Q.; XIONG, L. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.103, p.12987-12992, 2006.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.377–403, 1996.

ITO, Y.; KATSURA, K.; MARUYAMA, K.; TAJI, T.; KOBAYASHI, M.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. **Plant Cell Physiology**, v.47, p.141–153, 2006.

JAGLO-OTTOSEN, K. R.; GILMOUR, S. J.; ZARKA, D. G.; SCHABENBERGER, O.; THOMASHOW, M. F. Arabidopsis thaliana CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. **Science**, v.280, p.104–106, 1998.

JIA, Z.; LIAN, Y.; ZHU, Y.; HE, J.; CAO, Z.; WANG, G. Cloning and characterization of a putative transcription factor induced by abiotic stress in Zea mays. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p.6764-6771, 2009.

JIN, H.; MARTIN, C. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. **Plant Molecular Biology**, v.41, p.577–585, 1999.

JIN, X. F.; JIONG, A. S.; PENG, R. H.; LIU, J. G.; GAO, F.; CHE, J. M.; YAO, Q. H. OsAREB1, an ABRE binding protein responding to ABA and glucose, has multiple functions in Arabidopsis. **BMB Reports**, v.43, p.34-39, 2009.

JIN, H.; SUN, Y.; YANG, Q.; CHAO, Y.; KANG, J. & LI, Y. Screening of genes induced by salt stress from Alfalfa. **Molecular Biology Reports**, v.37, p.745-753, 2010.

JUNG, C.; SEO, J. S.; HAN, S. W.; KOO, Y.J.; KIM, C. H.; SONG, S. I.; NAHM, B. H.; CHOI, Y. D.; CHEONG, J. J. Overexpression of AtMYB44 enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.146, p.623–635, 2008.

KALEFETOĞLU, T.; EKMEKÇI, Y. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. **Journal of Science**, v.18, n.4, p.723-740, 2005.

KANG, J. Y.; CHOI, H. I.; IM, M. Y.; KIM, S. Y. Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. **Plant Cell**, v.14, p.343-357, 2002.

KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature Biotechnology**, v.17, p.287-291, 1999.

KASUGA, M.; MIURA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. A. Combination of the Arabidopsis DREB1A Gene and Stress-Inducible rd29A Promoter Improved Drought- and Low- Temperature Stress Tolerance in Tobacco by Gene Transfer. **Plant Cell Physiology**, v.45, p.346– 350, 2004.

KIM, Y. O.; KIM, J. S.; KANG, H. Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in Arabidopsis thaliana. **The Plant Journal**, v.42, p.890-900, 2005.

KIRIK, V.; KÖLLE. K.; MISÉRA. S.; BÄUMLEIN, H. Two novel MYB homologues with changed expression in late embryogenesis-defective Arabidopsis mutants. **Plant Molecular Biology**, v.37, p.819–827, 1998.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. Water relations of plants and soils. San Diego: **Academic Press**, 1995.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M. A.; FOROOTAN, A.; JONA, K. J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; SHLBERG, A.; ZORIC, N. The real time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p. 95-125, 2006.

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

LATA, C. & PRASAD, M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. **Journal Experiment Botany**, v.62, n.14, p.4731-4748, 2011.

LEE, S. J.; KANG, J. Y.; PARK, H. J.; KIM, M. D.; BAE, M. S.; CHOI, H. I.; KIM, S. Y. DREB2C interacts with ABF2, a bZIP protein regulating abscisic acid-responsive gene expression, and its overexpression affects abscisic acid sensitivity. **Plant Physiology**, v.153, p.716-727, 2010.

LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P. C.; ATHERTON, N. M.; HENDRY, G. A. F. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (Zea mays L.). **New Phytologist**, v.116, p.573-580, 1990.

LI, X. P.; TIAN, A. G.; LUO, G. Z.; GONG, Z. Z.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses. **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.1355–1362, 2005.

LISTER, R.; O'MALLEY, R. C.; TONTI-FILIPPINI, J.; GREGORY, B. D.; BERRY, C. C.; MILLAR, A. H.; ECKER, J. R. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis thaliana. **Cell**, v.133, p.523–536, 2008.

LIPPOLD, F.; SANCHES, D. H.; MUSIALAK, M.; SCHLERETH, A.; SCHEIBLE, W. R.; HINCHA, D. K.; UDVARDI, M. K. AtMyb41 Regulates Transcriptional and Metabolic Responses to Osmotic Stress en Arabidopsis thaliana. **Plant Physiology** v.149, p.1761-1772, 2009.

LIAO, Y.; ZOU, H. F.; WEI, W.;·HAO, Y. J.; TIAN, A. G.; HUANG, J.; LIU, Y. F.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y. Soybean GmbZIP44, GmbZIP62 and GmbZIP78 genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic Arabidopsis thaliana. **Planta**, v.228, p.225-240, 2008a.

LIAO, Y.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y.; ZHANG, W. K. Role of GmbZIP132 under abscisic acid and salt tresses. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.50, p.221-230, 2008b.

LI, X. P.; TIAN, A. G.; LUO, G. Z.; GONG, Z. Z.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses. **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.1355–1362, 2005.

LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain, separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low

temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis thaliana. **The Plant Cell**, v.10, p.1391–1406, 1998.

LIU ,N.; BOND, G. M.; ABEL, A.; McPHERSON, B. J.; STRINGER, J. Biomimetic sequestration of CO2 in carbonate form: Role of produced waters and other brines. **Fuel Processing Technology**, v.86, p.1615–1625, 2005.

LOPATO, S.; & LANGRIDGE, P. Engineering Stress Tolerance in Cereals Using DREB/CBF Genes: Outcomes, Problems and Perspectives. **ISB News Report**, 2011.

LUSCOMBE, N. M.; GREENBAUM, D. and GERSTEIN, M. What is Bioinformatics? A proposed Definition and Overview of the Field. **Methods of Information in Medicine**, v.40, p.346-347, 2001.

MARE, C.; MAZZUCOTELLI, E.; CROSATTI, C.; FRANCIA, E.; STANCA, A. M.; CATTIVELLI, L. Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold- and drought-response in barley. **Plant Molecular Biology**, v.55, p.399–416, 2004.

MARUYAMA, K.; SAKUMA, Y.; KASUGA, M.; ITO, Y.; SEKI, M.; GODA, H.; SHIMADA, Y.; YOSHIDA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis thaliana DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. **The Plant Journal**, v.38, p.982–993, 2004.

MARUYAMA, K.; TODAKA, D.; MIZOI, J.; YOSHIDA, T.; KIDOKORO, S.; MATSUKURA, S.; TAKASAK, H.; SAKURAI, T.; YAMAMOTO, Y. Y.; YOSHIWARA, K.; KOJIMA, M.; SAKAKIBARA, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Identification of Cis-Acting Promoter Elements in Cold- and Dehydration-Induced Transcriptional Pathways in Arabidopsis thaliana, Rice, and Soybean. **DNA Research**, v.19, p.37–49, 2012.

MARIONI, J.; MASON, C.; MANE, S.; STEPHENS, M. GILAD, Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome Research**, (doi:10.1101/ gr.079558.108), 2008.

MATSUKURA, S.; MIZOI, J.; YOSHIDA, T.; TODAKA, D.; Ito, Y.; MARUYAMA, K.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. **Molecular Genetics and Genomics**, v.283, p.185-196, 2010.

MEYERS, B. C.; GALBRAITH, D. W.; NElson, T.; AGRAWAL, V. Methods for Transcriptional Profiling in Plants. Be Fruitful and Replicate. **Plant Physiology**, v.135, p. 637-652, 2004.

MIRANDA, J. A.; AVONCE, N.; SUA´REZ, R.; THEVELEIN, J. M.; DIJCK, P. V.; ITURRIAGA, G. A bifunctional TPS–TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic Arabidopsis. **Planta**, v.226, p.1411–1421, 2007.

MITRA, R. D.; SHENDURE, J.; OLEJNIK, J.; EDYTA, K. O.; CHURCH, G. M. Fluorescent in situ sequencing on polymerase colonies. **Analytical Biochemistry,** v.320, p.55–65, 2003.

MIZOI, J.; SHINOZAK,i K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta**, (doi:10.1016/j.bbagrm.2011.08.004), 2012.

MORRAN, S.; EINI, O.; PYVOVARENKO, T.; PARENT, B.; SINGH, R.; ISMAGUL, A.; ELIBY, S.; SHIRLEY, N.; LANGRIDGE, P.; LOPATO, S. Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. **Plant Biotechnology Journal**, v.9, p.230-249, 2010.

MUNDY, P.; SIGMAN, M. & KASARI, C. A longitudinal study of joint attention and language development in autistic children. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v.20, p.115–128, 1990.

NAKASHIMA, K.; SHINWARI, Z. K.; SAKUMA, Y.; SEKI, M.; MIURA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. **Plant Molecular Biology**, v.42, p.657–665, 2000.

NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. **Plant Physiology**, v.126, p.62-71, 2006

NAKASHIMA, K.; TRAN, L. P.; NGUYEN, D. V.L.; FUJITA, M.; MARUYAMA, K.; TODAKA, D.; ITO, Y.; HAYASHI, N.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. **The Plant Journal**, v.51, p.617–630, 2007.

NAKASHIMA, K.; ITO, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI. Transcriptional Regulatory Networks in responsive to abiotic stresses in Arabidopsis thaliana and grasses. **Plant Physiology**, v.149, p.88-95, 2009.

NIELSEN, H. B.; WERNERSSON, R.; KNUDSEN, S. Design of oligonucleotides for microarrays and perspectives for design of multi-transcriptome arrays. **Nucleic Acids Research**, v.31, p.3491–3496, 2003.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Biotecnologia Ciência. & Desenvolvimento**, Brasília, v.33, p.10-13, 2004.

OH, S. J.; SONG, S. I.; KIM, Y. S.; JANG, H. J.; KIM, S. Y.; KIM, M.; KIM, Y. K.; NAHM, B. H.; KIM, J. K. Arabidopsis thaliana CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. **Plant Physiology**, v.138, p.341–351, 2005.

ÖKTEM, H. A.; EYIDOGĂN, F.; SELÇUK, Öz; M.T.; SILVA, J. A. T; YÜCEL, M. Revealing Response of Plants to Biotic and Abiotic Stresses with Microarray Technology. **Genes, Genomes and Genomics** – Global Science Book, 2008.

PAMMENTER, N.W.; Berjak, P.; Wesley-Smith, J.; Willigen, C.W. Experimental aspects of drying and recovery. In: Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying, CABI Publishing, Oxford, p.93–110, 2002.

PASSIOURA, J. B. Phenotyping for drought tolerance in grain crops: when is it useful to breeders? **Functional Plant Biology**, v.39, p.851–859, 2012.

PELLEGRINESCHI, A.; REYNOLDS, M.; PACHECO, M.; BRITO, R. M.; ALMERAYA, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; HOISINGTON, D. Stress-induced expression in wheat of the Arabidopsis thaliana DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. Genome, v.47, p.493–500, 2004.

PINHEIRO, G. L.; MARQUES, C. S.; COSTA, M. D. B. L.; Reis, P. A. B.; Alves, M. S.; CARVALHO, C. M.; FIETTO, L. G.; FONTES, E. P. B. Complete inventory of soybean NAC transcription factors: Sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. **Gene**, v.444, p.10-23, 2009.

POLIZEL, A.; MEDRI, M. E.; NAKASHIMA, K.; YAMANAKA, N.; FARIAS, J. R.; OLIVEIRA, M. C. N.; MARIN, S. R. R.; ABDELNOOR, R. V.; MARCELINO-GUIMARAES, F. C.; FUGANTI, R.; RODRIGUES, F.A.; STOLF, R.; BENEVENTI, M. A.; ROLLA, A. A. P.; NEUMAIER, N.; YAMAGUCHI- SHINOZAKI, K.; CARVALHO, J. F. C.; NEPOMUCENO, A. L. Molecular, anatomical and physiological properties of a genetically modified soybean line transformed with rd29A:AtDREB1A for the improvement of drought tolerance. **Genetics and Molecular Research**, v.10, 2011.
QIN, F.; SAKUMA, Y.; LI, J.; LIU, Q.; LI, Y.Q.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in Zea mays L. **Plant and Cell Physiology**, v.45, p.1042–1052, 2004.

QIU, Y.; YU, D. Over-expression of the stress-induced OsWRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in Arabidopsis thaliana. **Environmental and Experimental Botany,** v.65, p.35–47, 2009.

RAI, M.; HE, C.; WU, R. Comparative functional analysis of three abiotic stress-inducible promoters in transgenic rice. **Transgenic Research**, v.18, n.5, p.787–799, 2009.

RICHARDS, R. A. Crop improvement for temperate Australia - future opportunities. **Field Crops Research**, v.26, p.141–169, 1991.

RIERA, M.; VALON, C.; FENZI, F.; GIRAUDAT, J.; LEUNG, J. The genetics of adaptive responses to drought stress: abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent signalling components. **Physiology Plantarum**, v.123, n.2, p.111–119, 2005.

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; MITTLER, R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. **Plant Physiology**, v.130, p.1143-1151, 2002.

ROY, S. D.; SAXENA, M.; BHOMKAR, P. S.; POOGGIN, M.; HOHN, T.; BHALLA-SARIN, N. Generation of marker-free salt tolerant transgenic plants of Arabidopsis thaliana using the gly I gene and cre gene under inducible promoters. **Plant Cell**, Tissue and Organ Culture, v.95, n.1, p.1–11, 2008.

SANTOS, R. F. & CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológicos e fisiológicos das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.2, p.287-294, 1998.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v.270, p.467–470,1995.

SCHWECHHEIMER, C.; ZOURELIDOU, M.; BEVAN, M. W. Plant transcription factor studies. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.49, p.127–150, 1998.

SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, T.; NELSON, W.; HYTEN, D. L.; SONG, Q.; THELEN, J. J.; CHENG, J.; XU, D.; HELLSTEN, U.; MAY, G. D.; YU, Y.; SAKURAI, T.; UMEZAWA, T.; BHATTACHARYYA, M D.; SANDHU, D.; VALLIYODAN, B.; LINDQUIST, E.; PETO, M.; GRANT, D.; SHU, S.; GOODSTEIN, D.; BARRY, K.; FUTRELL-GRIGGS, M.; ABERNATHY, B.; DU, J.; TIAN, Z.; ZHU, L.; GILL, N.; JOSHI, T.; LIBAULT, M.; SETHURAMAN, A.; ZHANG, X. C.; SHINOZAKI, K.; NGUYEN, H. T.; WING, R. A.; CREGAN, P.; SPECHT, J.; GRIMWOOD, J.; ROKHSAR, D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R. C.; JACKSON, S. A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. Nature, v. 463, p. 178-83, 2010.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ABE, H.; KASUGA, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. **The Plant Cell**, v.13, p.61–72, 2001.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ISHIDA, J.; NANJO, T.; FUJITA, M.; OONO, Y.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; TAJI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **The Plant Journal**, v.31, p.279–292, 2002.

STOCKINGER, E. J.; GILMOUR, S. J.; THOMASHOW, M. F. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v. 94, p.1035–1040, 1997.

SUA'REZ, R.; CALDERON, C. and ITURRIAGA, G. Enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic alfalfa accumulating trehalose. **Crop Science**, v.49, p.1791–1799, 2009.

PEREIRA, S. S.; GUIMARÃES, F. C. M.; CARVALHO, J.F.C.; STOLF-MOREIRA, R.; OLIVEIRA, M. C. N.; ROLLA, A.A.P.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A. L. Transcription factors expressed in soybean roots under drought stress. **Genetic Molecular Research**, v.10, n.4, p. 3689-3701, 2011.

PAZ-ARES, J.; GHOSAL, D.; WIENAND, U.; PETERSON, P. A.; SAEDLER, H. The regulatory cl locus of Zea mays encodes a protein with homology to myb proto-oncogene

products and with structural similarities to transcriptional activators. The **EMBO Journal**, v.6, p.3553-3558, 1987.

SAINT PIERRE, C.; CROSSA, J. L.; BONNETT, D.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; REYNOLDS, M. P. PHENOTYPING transgenic wheat for drought resistance. **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.1799–1808, 2012

SKIVER, K.; OLSEN, F.L.; ROGERS, J.C.; MUNDY, J. Cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.88, p.7266-7270, 1991.

SINGH, B. B. & MATSUI, T. Breeding Cowpea Varieties for Drought Tolerance. In: Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea Production, Fatokun, C.A.; S.A. Tarawali, B.B. Singh, P.M. Kormawa and M. Tamo (Eds.). IITA, Ibadan, p. 287-300, 2002.

SHEN, Q.; ZHANG, P.; HO, T. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. **The Plant Cell**, v.8, p.1107–1119, 1996.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v.270, p.467–470, 1995.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, p.217-223, 2000.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion Plant Biology**, v.6, p.410-417, 2003.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.2, p.221-227, 2007.

SUNKAR, R. Plant stress tolerance: methods and protocols. Totowa, N.J.: Humana Press. 639 p., 2010

TAIZ, L. & ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3º edição. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TRAN, L-S.; NAKASHIMA, K.; SAKUMA, Y.; SIMPSON, S. D.; FUJITA, Y.; MARUYAMA, K.; FUJITA, M.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress inducible NAC transcription factors that bind to a drought responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. **Plant Cell**, v.16, p.2481–2498, 2004.

TRAN, L.-S. P.; NAKASHIMA, K.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Plant gene networks in osmotic stress response: from genes to regulatory networks. **Methods in Enzymology**, v.428, p.109-128, 2007.

UNO, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis thaliana basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.97, p.11632–11637, 2000.

VADEZ, V.; RAO, S.; SHARMA, K. K.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; DEVI, J. M. DREB1A allows for more water uptake in groundnut by a large modification in the root/shoot ratio under water deficit. **International Arachis Newsletter**, v.27, p.27–31, 2007.

VADEZ, V.; RAO, J. S.; BHATNAGAR-MATHUR, P. & SHARMA, K. K. DREB1A promotes root development in deep soil layers and increases water extraction under water stress in groundnut, **Plant Biology**, v.45, p.45-52, 2013.
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 affects plant water status. **The Plant Journal**, v.45, p.523-539, 2006.

WANG, Y.; YING, J.; KUZMA, M.; CHALIFOUX, M.; SAMPLE, A.; MCARTHUR, C.; UCHACZ, T.; SARVAS, C.; WAN, J.; DENNIS, D. T.; McCOURT, P.; HUANG, Y. Molecular tailoring of farnesylation for plant drought tolerance and yield protection. **Plant Journal**, v.43, p.413–424, 2005.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v.10, p.56-63, 2009.

WANG, C-T.; QUAN, Y.; YANG, Y-M. Characterization of the ZmDBP4 gene encoding a CRT/DRE-binding protein responsive to drought and cold stress in maize. **Acta Physiology Plant**, v.33, p.575–583. (doi 10.1007/s11738-010-0582-y), 2011.

WALTERS, C.; FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Desiccation stress and damage. In: Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying (Black, M. & Pritchard, H.; eds.). **CABI Publishing**, p.263–291, 2002.

WITTENMAYER, L.; MERBACH, W. Plant responses to drought and phosphorus deficiency: contribution of phytohormones in root-related processes. **Journal Plant Nutrition Soil Science**, v.168, p.531-540, 2005.

XIANG, Y.; TANG, N.; DU, H.; YE, H.; XIONG, L. Characterization of OsbZIP23 as a Key Player of the Basic Leucine Zipper Transcription Factor Family for Conferring Abscisic Acid Sensitivity and Salinity and Drought Tolerance in Rice. **American Society of Plant Biologists**, v.148, p.1938-1952, 2008.

XIONG, J. Essential Bioinformatics, Texas A&M University, 2006, p.10-16.

XU, Z. S.; CHEN, M.; LI, L.C.; MA, Y. Z. Functions of the ERF transcription factor family in plants. **Botany**, v.865, p.969–977, 2008.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. & SHINOZAKI, K. Arabidopsis DNA encoding two desiccation-responsive rd29 genes. **Plant Physiology**, v.101, p.1119-1120, 1993.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; SHINOZAKI, K. A novel cis-acting element in an Arabidopsis thaliana gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. **Plant Cell**, v.6, p.251–264, 1994.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review Plant Biology,** v.57, p.781–803, 2006.

YOSHIDA, T.; FUJITA, Y.; SAYAMA, H.; KIDOKORO, S.; MARUYAMA, K.; MIZOI, J.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. **The Plant Journal**, v.61, p.672-685, 2010.

ZHENG, X.; CHEN, B.; LU, G.; HAN, B. Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.379, p.985–989, 2009.

ZOU, M.; GUAN, Y.; REN, H.; ZHANG, F.; CHEN, F. A bZIP transcription factor, OsABI5, is involved in rice fertility and stress tolerance. **Plant Molecular Biology**, v.66, p.675-683, 2008.

CAPÍTULO 1

5 Phenotyping DREB1A soybean plants for drought tolerance at laboratory and field

5.1 Abstract

The development of drought tolerant plants is highly sought as areas suffering with drought are due to increase in the future. One strategy being used for this purpose is the genetic engineering of plants with transcription factors that regulates the expression of several genes related to abiotic stress. The *DREB1A* gene driven by stress inducible promoter, *rd29A* was introduced into a drought-sensitive soybean cultivar BR16 through biolistic. Some of the lines obtained (P58 and P1142) and a crossing between the cultivar BR16 and P58, named 09D-0077 were tested for drought tolerance at glasshouse and/or field. Drought was simulated in the greenhouse by exposing the plants to a progressive soil drying in pot culture. In the field, performance was evaluated under three different water regimes, irrigated, natural drought (non irrigated) and under water stress at the vegetative or reproductive stages using rain-out shelters. We were able to show that although the DREB plants did not outperformed the cultivar BR16 in terms of yield, there was a clear tendency of superiority in some yield components such as number of seeds, number of pods with seeds and total number of pods when stress was applied at the vegetative stage. Tolerance mechanisms of DREB plants seemed to involve a conservative use of water when the plants were at well watered conditions through lower transpiration rates. Further studies are needed to better characterize the conditions (soil and atmosphere) in which these plants may outperform the non-transformed parental.

Key words: BR 16, *DREB1A*, Embrapa 48, transpiration, transcription factor, water-deficit

5.2 Introduction

Water deficit is a major abiotic stress factor limiting crop yield. Considering only the soybean losses, in the USA, the primary world soybean producer, drought periods throughout the 2007 season caused a loss of US$787.2 million in agricultural production. In Brazil, the second highest world soybean producer, during the 2003/2004 and 2004/2005 seasons, the southern states, which are responsible for 40% of the country´s soybean production, lost more than 20% of its production due to water deficit, reaching US$2.3 billion in economic losses (Embrapa, 2004; Conab, 2005). Recently in the 2010/2011 season the national production reached 75 million tons, however in 2011/2012 this production dropped to 65.6 million due to drought (Conab, 2012).

Breeding for drought tolerance is difficult through conventional approaches because it is a multigenic as well as a quantitative trait. Besides, plant responses to drought are influenced by the time, intensity, duration, and frequency of the stress as well as by diverse plant–soil–atmosphere interactions (Bhatnagar-Mathur *et al.,* 2007).

One alternative approach being used to develop drought tolerant plants is the genetic engineering of plants with transcription factors (TFs). TFs recognize specific DNA sequences in the regulatory regions of target genes and leads to the activation of downstream genes responsive to abiotic stresses. One such class of the transcription factors is the dehydration-responsive element-binding proteins (DREBs) that are transcriptionally up-regulated by water deficit or low temperature (Liu *et al.,* 1998).

DREB/CBFs proteins have a single 60 amino acid-long DNA binding AP2 domain, which permits them to specifically recognize and bind as a single molecule to so-called drought/cold/salt-stress responsive promoter elements, having the consensus (A/G)CCGAC. The expression of individual DREB/CBFs may be regulated by drought, salt, and cold, or by drought and cold only. The expression of most studied DREBs/CBFs is low or very low in the absence of stress and is induced moderately under stress (Lopato and Langridge, 2011).

Due to the central role of DREBs/CBFs in abiotic stress responses and their ability to regulate a large number of target 'stress-responsive' genes, they have become popular targets for genetic engineering to improve abiotic stress tolerance in various plant species (Lopato and Langridge, 2011).

DREB1A overexpression delayed death following withdrawal of irrigation in transgenic wheat (Pellegrineschi *et al*., 2004). Improvements in tolerance to drought, salinity and low-temperature stresses have been reported in *Arabidopsis* (Kasuga *et al.*, 1999), potato (Behnam *et al*., 2006), tobacco (Kasuga *et al*., 2004), rice (Oh *et al.*, 2005) and wheat (Pellegrineschi *et al.*, 2002). More recently it has been demonstrated that constitutive over-expression of two wheat DREB factors in barley substantially improved survival under severe drought or cold (Morran *et al.*, 2010).

On the other hand, transgenic plants constitutively over-expressing DREB/CBFs express undesirable developmental traits, such as stunted growth and delayed flowering (Kasuga *et al.*, 1999; Kasuga *et al.*, 2004; Morran *et al*., 2010; Saint Pierre *et al*., 2012) so, one achievement of this technology was the use of stress inducible promoters, such as the *rd29A*, that apparently overcomes the difficulties encountered when using constitutive promoters.

In our laboratory soybean transgenic plants overexpressing the DREB1A TF under the

control of the *rd29A* promoter has been generated. Tolerance of the transformed lines under moderate and severe water stress was accessed by Beneventi (2006) and Polizel *et al.* (2011). It was found that senescence occurred in a later stage for a DREB1A line, named P58, in comparison with its isoline BR16. Besides, after severe water stress (2.5% gravimetric humidity) this line maintained higher values of net photosynthesis and photosynthetic efficiency, therefore it was considered as drought tolerant.

According to Passioura *et al.* (2012), the results obtained in controlled conditions may not be well connected to the way plants behave season-long in the field; thus, testing DREB plants in the field is important as this will attest for the success of the technology. Considering that few studies have reported results from genetically modified crops in realistic field conditions and that there is a lack on the understanding towards the tolerance mechanisms of DREBs transgenic plants, the present work aimed:

- To test if the genetic engineering of soybean for abiotic stress tolerance can be achieved by stress inducible expression of the transcriptional factor DREB1A without any detrimental effects on plant growth and development
- To investigate plant performance under field conditions in a drought and non-drought environment
- To give new insights towards the tolerance mechanism of the DREB1A plants

5.3 Material and Methods

5.3.1 Plant Material

A drought-sensitive Brazilian soybean cultivar, BR16 (Oya *et al*., 2004) was transformed with the *rd29A:AtDREB1A* (Patent Nos. P3183458 and P3178672) construct by particle-bombardment according to Aragão *et al.* (2000) and Rech *et al.* (2008). The transformation method, selection, and regeneration procedures were described in Beneventi (2006). The lines obtained (P58, P59, P1142, P1378 and P3069) were submitted to molecular analysis and from these studies the lines P58 and P1142 were chosen (see northern blot analysis). The line P58 was further characterized through physiological and agronomical studies along several generations in greenhouse conditions (Beneventi, 2006, Polizel *et al*., 2011; Salinet 2009). From these studies the lines P58 (T8) and P1142 (T5) were chosen for

further characterization and/or performance evaluation in the field in our studies. In a next step the line P58 was crossed with its isoline, the BR 16 cultivar, producing the genotype 09D-0077. Plants resulting of the crosses that were PCR positive for the transgene were selected in greenhouse based on recuperation after water stress and let to produce seeds. These seeds were used in the field experiment.

5.3.2 Northern blot analysis

Soybean seeds were sown in triplicate and grown in soil:vermiculite (1:1) for 20 days at 28 ^{0}C, 12h/12h light/dark cycle. Hoagland´s solution was added to the pots twice a week until the plants had reached the V4 developmental stage. At this stage the pots were divided in three subsets, leaf samples were harvested from subset one and irrigation of the subsets two and three was suspended for four and six days. At these times leaf samples were harvested, placed in liquid nitrogen and stored at -80 ^{0}C for RNA extraction.

Total RNA was extracted from all lines using TRIZOL (*Invitrogen - Life Technologies*) reagent according to the manufacturer's instructions. For the northern blot analysis 10 µg of total RNA was separated by electrophoresis in a 1% agarose-formaldehyde gel for 2h and transferred to an Amersham HybondTM-N+ (GE Healthcare) membrane. Probe was prepared using cDNA from P58 GM line amplified using specific primers that amplifies the target gene *AtDREB1A* and labeled with [a^{32}P]d-CTP. Hybridization was performed for 16h, at 42ºC and after that the membranes were washed with a series of buffers (1 x SSC / 0.1 % SDS; 0.1 x SSC / 0.1% SDS) to remove the probe excess they were placed to expose in a Kodak BioMax film.

5.3.3 Recovery of DREB1A plants after water deficit

Seedlings were cultivated into 1.0 kg pots containing a mixture of soil:sand:manure (1:3:1; 26% water holding capacity) in well-watered conditions (70% of the holding capacity) until the V_3 developmental stage (Fig. 1B). Prior to the stress initiation, the pots were saturated with water and thereafter irrigation was stopped. After a period of approximately six days the plants were re-irrigated and recovery after water stress was accessed after three days by counting the plants that survived the stress period.

5.3.4 The phenotype, transpiration, relative growth ratio and percentage of reduction of growth of DREB1A plants under water stress

Soybean seeds of the lines P58 and P1142, generations T8 and T5 respectively, and BR16 cultivar were germinated on filter paper for four days in growth chamber where temperature and air relative humidity were set to 25 ± 1 °C and 100%, respectively. Seedlings were cultivated into 3.0 kg (Fig.1A) pots containing a mixture of soil:manure:sand (2:2:1; 39% water holding capacity) in well-watered conditions (70% of the holding capacity) until the V_4 developmental stage (Fehr *et al.*, 1971). Greenhouse temperature and air humidity was monitored every 5 minutes using a termo-hygrograph Hobo U14-002 (Onset®). The vapor pressure deficit was calculated using the atmospheric temperature and relative humidity (RH) using the formula = VPD (100-RH)/100*PVsat (kPa). PVsat was calculated using psychrometric chart available in http://physics.holsoft.nl/physics/ocmain.htm.

At the V_4 stage, 30 days after sowing (DAS), the pots were divided in three subsets. Subset one with six replicated plants per genotype was harvested, divided in roots and shoots to estimate the initial dry plant biomass, while the other two were either used as control (C) or drought stressed (DS) treatments. The experimental design was set as completely randomized block design in factorial scheme (2x3) with three blocks and two plants per block. The treatments were: two water regimes (control-C and drought stressed-DS) and three genotypes, the cultivar BR 16 and the DREB1A lines: P58 and P1142.

Prior to the stress initiation at 30 DAS, the pots of both C and DS treatments were saturated with water and left overnight to drain the excess water. On the following morning, the pots were enclosed in polythene bags to prevent any water loss by evaporation from the soil surface. Thereafter, the pots were weighed every morning between 09:00 and 10:00 hours Brazilian Standard Time (IST). In the controls plants water loss by transpiration in a previous day was compensated in the following day by adding water to 70% of the field capacity. In the DS plants field capacity of the pot was progressively adjusted to 40% (moderate) and thereafter 20% (severe stress). The transpiration of each plant was calculated as the difference in pot weights on successive days plus water added on the previous day.

At the end of the experiment the plants were harvested and divided in roots and shoots to estimate final dry plant biomass. The total transpiration was calculated as a sum of the daily transpiration from the initial day when plants were bagged to the day when plants were

harvested. The TE could then be calculated as the plant biomass gained between the first and final plant sampling divided by total transpiration during that period.

Growth was analyzed through the relative growth rate (g g^{-1} day^{-1}) as mean values across one harvest interval (t2-t1) by using the equation: (Ln W2-Ln W1) / (t2-t1), where W2 and W1 is the dry matter of the plants at the 30 DAS and at after final harvesting. Reduction on weight (%) was calculated as the rate between the whole plant dry weight (g) in the water stressed condition by the whole plant dry weight (g) in the control condition multiplied by 100. Phenotype was analyzed through measurements of number of leaves, leaf area (length*width), height, length of the internode.

5.3.5 Transpiration, transpiration efficiency, estomatal conductance and photosynthesis under two changing conditions of vapor pressure deficits

In order to verify the plants responses to the changes in the atmosphere vapor pressure deficit (VPD) an experiment was set in Fitotron CE cabinets. Seeds were germinated on filter paper for four days in growth chamber where temperature and air relative humidity were set to 25 ± 1 °C and 100%, respectively. The plantlets were transferred to pots containing 1.0 kg soil: sand: manure (1:3:1; 26 % water holding capacity) and kept in a environment with low vapor pressure deficit [(RH=60% and day/night temperature = 25/20^{O}C)] and well watered conditions (100-70% field capacity) until the V_3 developmental stage. At this stage the pots were divided into two subsets; sub set one with ten replicated plants was harvested to estimate initial dry plant biomass. The other set was saturated with water and left overnight to drain the excess water. On the following morning, the pots were enclosed in polythene bags to prevent any water loss by evaporation from the soil surface. After, photosynthetic rate (*A*), stomatal conductance (g_s), were evaluated using a Model LI-6400 Portable Photosynthesis System (LiCor, Inc.) Parameters were measured on middle leaflet from the second leaf node totally expanded under photon flux density of 1,000 μmol m^{-2} s^{-1}. Thereafter, the pots were weighed every morning between 09:00 and 10:00 hours Brazilian Standard Time (IST).

During seven days after initiation of the stress the plants were kept under low vapor pressure deficit [(RH=60% and day/night temperature = 25/20^{O} C)]. After a period of 7 days without irrigation, relative humidity and temperature of the cabinets were changed to 35% and 35/30^{O}C (day/night) respectively for three days. At the end of this period the plants were harvested and divided in roots and shoots to estimate final dry plant biomass. Transpiration and transpiration efficiency were calculated as described previously.

The experimental design was the completely randomized in a factorial scheme (3x2). The treatments were the three genotypes (P58, P1142 and BR16) and the two water regimes (control and drought stressed).

Figure 1.

5.3.6 Evaluation of growth and yield at field conditions

In order to test the plants performance under field conditions, an experiment was carried out at Embrapa Soybean (Londrina-PR, Brazil) during the 2011/12 season. Soil chemical corrections and cultivations were according to recommendations for this crop (Embrapa, 2011). Daily precipitation and temperature (maximum, minimum and average) during the season was obtained from a meteorological station at Embrapa Soybean. From this data a water balance was calculated according to Thornthwaite and Mather (1955) by Crusiol *et al.* (2012). It was shown that evapotranspiration was in excess of precipitation at several stages (Fig. 2) and any previously available moisture was used.

Figure 2.

The experimental design was a randomized complete block with treatments arranged in split plot and four replicates. The main plots received four different water regimes consisting of: irrigated (I, matric soil-water potential was maintained between -0.03 and -0.05 MPa), non-irrigated (NI, natural rainfall) and plants artificially drought stressed at the vegetative (ER) or reproductive (EV) stages. To simulate the drought stress the plants were sheltered from rain using rain out shelters programmed to automatically close on the first incidence of rainfall event and open as soon as the rain stops at each chosen stage. Soil humidity was monitored daily by tensiometers placed at 30 cm soil depth, and weekly by the gravimetric and psycrometric methods. The treatments in the sub-plots were: the soybean cultivars BR 16 regarded as drought sensitive, the GM line DREB1A P58 and the crossing 09D-0077, resulting from crosses between DREB1A plants and the cultivar BR 16. Components of growth, such as height (H), number of nodes (NN), leaf area (LA), leaf area index (LAI) and shoot fresh (SFW) and dry weights (SDW) were obtained. The leaf area index was calculated as the ratio between leaf area and the area unit of land occupied by the plant. Apparent harvest index, yield and its components such as number of seeds (NS),

number of pods (NP), 100-seed weight (100-SW) were also evaluated when all plants had reached the R8 stage. Plot grain yields (at 13% humidity) were calculated using the equation: Yield (Kg/ha) = (100 –grain humidity at harvest, %) x (harvested grain weight, Kg x 10000) / plot harvested area, m^2).

5.3.7 Statistics

The methods of statistical analysis applied to all response variables consisted of an exploratory diagnostic, checking assumptions of normality and independence of the residue, the additivity of the model, and the homogeneity of treatment variances, followed by analysis of variance (ANOVA). After these analyses and when the F test showed statistical significance, the Duncan test for multiple comparisons among treatment means, at the level of significance of α=0.5 was applied.

5.4 Results

5.4.1 Northern blot analysis

The *DREB1A* gene expression was induced in the transformed plants not only under water stress but also under control (well watered) conditions at lower intensity (Fig. 3). Expression in all conditions was higher for the line P58.

Figure 3

5.4.2 Recovery of DREB1A plants after stress

It can be seen from Fig. 4 that the survival rate of the DREB plants and BR 16 were 70% (P58), 60% (P1142) and 40% (BR 16).

Figure 4

5.4.3 The phenotype, transpiration, relative growth ratio and percentage of reduction of growth of DREB1A plants under water stress

Growth analysis of the plants within the water deficit period is shown on Fig. 5. It was found that the DREB1A plants had lower height (C/DS); same number of nodes (C/DS); slightly higher number of leaves (DS) and leaf area (C/DS-P58) than BR 16 plants. However, statistical analysis of these date showed no significant differences, indicating that transformation of soybean plants with the *DREB1A* gene under the control of the *rd29A* promoter did not cause any growth retardation on the transformed plants.

Quantification of the stress level was assessed by the stomatal conductance according to Flexas *et al*. (2004). The plants were considered under control (well watered), moderate and severe water stress when their *gs* was $\geq$0.2 molH_2O $m^{-2}s^{-1}$, = 0.1 a 0.2 molH_2O $m^{-2}s^{-1}$ and $\leq$0.1 molH_2O $m^{-2}s$ respectively. Therefore, the plants designated to the control treatment and maintained at well watered conditions presented *gs* values that varied between 0.16 to 0.2 molH_2O $m^{-2}s^{-1}$ and this variation was not statistically significant (Fig. 6). In the same way plants under water stress presented *gs* values within the expected values assigned by Flexas *et al.* (2004).

These findings indicated that the plants in our experiments were submitted to the same level of stress after suspension of irrigation and therefore comparisons among the genotypes within each treatment were adequate.

Statistical differences on the gas exchange (*A* and *gs*) were found between well watered and water stress condition, however, no differences among the genotypes were found within each treatment (Fig. 6).

The Fig. 7 shows that differently from the BR 16 plants, the DREB1A plants did not show any symptoms of drought under moderate water stress (Fig. 7A), however, under severe water stress wilting symptoms were similar in plants of the P1142 line and the BR 16 cultivar (Fig. 7B).

Figure 5.

Figure 6.

Figure 7.

It has been documented that for some genotypes, a decline in transpiration when the soil is still relatively wet is a plant mechanism of saving water in the soil profile for use at later stages. Daily transpiration under control and water stress condition was assessed in the DREB plants through the daily weighting of the pots (Fig. 8).

Figure 8.

It was found that transpiration of P58 plants was lower than the other two genotypes under control condition, when water was fully available to supply the plant´s demand (Figure 8A) at some time points. Under water stress conditions there were no significant differences among the genotypes, except at the beginning of the water stress period (Fig. 8B). Analysis of the VPD in the greenhouse allowed to verify that major differences in the transpiration among the genotypes occurred at high VPD (28 Aug and 5th Sept) (Fig. 9). From the data of the pots weight it could be verified that at the dates 28-30th Aug the plants were still in a good water availability condition.

Figure 9.

In order to test the effects of the VPD on the plant´s transpiration an experiment was carried out in controlled conditions (fitotron cabinet) where the plants were submitted to a change in the atmospheric VPD within the period of suspension of the irrigation. It was confirmed that at high VPD (2.3 kPa) the P58 line had a lower transpiration than the BR 16 plants. However at the end of the water stress period transpiration of BR 16 plants was lower than the DREB plants (Fig. 10).

Figure 10.

From the data of transpiration and gain of dry mass over the water stress period, transpiration efficiency (TE) (Fig. 11) was calculated. It was found that the DREBs plant has higher TE than the BR 16 plants. Negative TE for the BR 16 plants can be explained by the fact that for some plants within the repetition, the final dry weight minus the initial dry weight (obtained at the beginning of the water stress) resulted in negative values indicating that these plants were losing weight, through the respiratory metabolism. Occurrence of respiration instead of photosynthesis was verified by the negative readouts of *A* in the Licor equipment.

Figure 11.

From the data available the relative growth ratio (Fig. 12A) as well as percentage of reduction on growth (Fig. 12B) under water stress in relation to the plants in the control condition were calculated. It seems that when water was available (control condition) the plants of the P58 line had slightly lower RGR, however, under water stress both transgenics had slightly higher RGR. Although non statistically significant, these differences is an extra indication that under control conditions the DREB lines has a more conservative growth pattern and that under water stress they have a slight increase in growth.

Figure 12.

5.4.4 Evaluation of growth and yield at field conditions

The Fig. 13A shows the experiment at the field conditions and the rain out shelters which has proved an efficient system to simulate the water stress. Fig. 13B shows the same experiment later in the season. It can be noticed that the slow wilting phenotype of the P58 plants was also observed at field conditions.

Figure 13.

From the Fig. 14 it can be seen that there was no significant differences on the growth components of the plants of the line P58 and the crossing 09D-0077 at the field conditions.

Figure 14.

Regarding to the yield components (Fig. 15) no significant differences were found among the genotypes, except for the number of nodes which were higher for the P58 line in the NI treatment and for the crossing 09D-0077 in the water stress at the vegetative stage. It should be noticed however that when the water stress was applied at the vegetative stage there was a clear tendency of reduction on the yield components (number of seeds and total number of pods) of the BR16 plants when compared to the plants of the line P58 and crossing 09D-0077.

Figure 15.

5.5 Discussion

The development of drought tolerant plants is highly sought as areas suffering with drought are due to increase in the future. One strategy being used for this purpose is the genetic engineering of plants with transcription factors (TF) that regulates the expression of several genes related to abiotic stress. As the basis for the drought-adaptative mechanisms are normally under multigenic control this seems to be a wise strategy (Blum, 2005; Pinto *et al.*, 2010; Saint Pierre *et al*., 2012)

Previous reports have shown that the TF DREB1A specifically interacts with dehydration response element (DRE) and induces expression of several genes related to stress tolerance. In our studies soybean plants overexpressing the *DREB1A* gene, under the control of the *rd29A* promoter, were obtained and two lines (P58 and P1142) were tested for drought tolerance at greenhouse and/or field conditions.

We found that overexpression of the *DREB1A* gene in the transformed soybeans was induced not only under water stress but also under control conditions at lower intensity (Fig. 3). The *Arabidopsis rd29A* promoter is drought-inducible, but induction of *AtRD29A:DREB1A* in transgenic tobacco under normal conditions has already been described (Kasuga *et al.,* 1999). According to Kasuga *et al.* (1999, 2004), even when there is a leaking in control conditions the *rd 29A* promoter is still considered stress induced as it should have a higher level of expression under stress if compared to the *35S* promoter. Besides the use of stress inducible promoters, would overcomes the difficulties encountered when using constitutive promoters such as the *35S*, which is frequently associated with plant growth retardation (Kasuga *et al.,* 1999; Kasuga *et al*., 2004, Morran *et al*., 2010)

Growth analysis of the two DREB1A lines (P58 and P1142) at greenhouse and field conditions revealed that differences in growth were not statistically significant and that they were mainly related to shortening of internodes in plants of the line P58 which in turn resulted in plants with lower height. For the line P1142 no differences in growth were observed at both water stress and control conditions (Fig. 5 and 12).

We demonstrated here that under well irrigated conditions soybean DREB plants seemed to have a more conservative growth pattern due to lower RGR when compared to BR16 plants (Fig. 12A). Under water stress, however, growth ratios of the BR16 plants slowed down allowing slightly higher RGR for the transgenic plants. This behavior resulted in lower percentage of reduction on growth (shoot dry mass under stress/ shoot dry mass under stress under well watered conditions *100) for the transgenic plants when at water

stress conditions (Fig. 12B). Although no statistically significant it seems that DREB plants had higher number of leaves and leaf area than the BR 16 plants at least at latter stages of the development (Fig 5 and 13B).

Previous studies under laboratory and greenhouse conditions (Beneventi, 2006; Polizel *et al*., 2011 and Salinet, 2009) showed that the line DREB1A P58 had a slow wilting phenotype and were able to maintain a higher rate of photosynthesis and photosynthetic efficiency under water stress (Beneventi 2006 and Polizel *et al*., 2011).

We found that survival rates of the P58 (70%) and P1142 (60%) were higher than the BR 16 (40%) after severe water stress. The plants were then considered higher drought survival as their tissues had the capacity to withstand dessication and the plants remained viable for growth. At field conditions the slow wilting phenotype was also observed (Fig. 13B).

Results from pot experiments for the DREB gene in wheat (Pellegrineschi *et al*., 2004; Gao *et al*., 2009) and other crops such as tobacco (Kasuga *et al*., 2004), rice (Dubouzet *et al*., 2003), maize (Qin *et al*., 2004), groundnut (Bhatnagar- Mathur *et al*., 2004), and soybean (Li *et al*., 2005) also showed the higher survival and recovery after severe water deficit.

It has been suggested that the improved survival after severe drought in genetically modified plants relative to controls could be associated with either the activation of genes related to drought resistance or to a reduced consumption of water resulting from smaller plant sizes, i.e. a more conservative growth pattern in the transgenics compared with controls (Bhatnagar- Mathur *et al*., 2004; Morran *et al*., 2010; Saint Pierre *et al*., 2012).

Reduction in water consume when in well watered conditions could be one of the explanations for the higher survival rates and capability of sustain growth of the DREB plants. In fact, the P58 plant´s transpiration when in well watered conditions (Fig. 8A) was lower when compared to plants of the BR16 cultivar despite of the absence of differences in leaf area and number of leaves among these genotypes. Under water stress however, no differences in the transpiration were found (Fig. 8B).

A decline in the transpiration rates when the soil is relatively humid has been claimed as a mechanism that results in water conservation and this mechanism have been verified in maize (Ray and Sinclair, 1997), soybean (Vadez and Sinclair, 2001 and Hufstetler *et al*., 2007) and peanuts (Bhatnagar-Mathur *et al*., 2007).

It should be noticed that *DREB1A* gene expression was induced in the transformed plants not only under water stress but also under well watered conditions at lower intensity

(Fig. 3). Such expression must alter the physiological responses of the transformed plants in this condition.

Using the data of transpiration and gain of dry mass over the stress period we calculated the plant´s transpiration efficiency (TE-Fig. 11). TE is related to the water use efficiency through the formula: WUE (biomass)=TE/(1+E_s/T) proposed by Richards (1991) where E_S is the water lost by evaporation from the soil surface and T is the water lost through transpiration. Because in our studied E_S is null as the pots were bagged with plastic bags to prevent evaporation from the soil surface, then TE=WUE.

It was found that DREB plants had higher TE at least at the beginning of the water stress period but not in well watered conditions. These finding differs from that obtained for DREB peanuts where except for one event, all DREB plants under study achieved higher transpiration efficiency (TE) under well irrigated conditions due to lower stomatal conductance. For DREB1A groundnut, improved water use efficiency appeared to be related mainly to a large modification on the root/shoot ratio under water deficit (Vadez *et al.*, 2007). More recently Vadez et al. (2013) showed that overexpression of DREB1A in *Arachis hypogaea* promoted rotting especially at the deep layers of the soil.

In this study higher TE of the soybean DREB plants seemed to be related to higher dry mass accumulation over the stress period rather than decreased transpiration due to changes in the stomatal conductance under water stress as found by Bhatnagar-Mathur *et al*. (2006) for peanuts. Good indication for this is that negative values were found when final dry weight of BR 16 plants was subtracted from the initial dry weight during the water stress period. Therefore, it seems that, while DREB plants were accumulating organic matter at low rates during the water stress period, BR16 plants were dying or losing weight, most likely, through the respiratory metabolism.

Polizel *et al.* (2011) showed that the DREB1A-P58 soybean plants have reduced palisade parenchyma probably caused by a higher proximity of the cellular layers and ticker abaxial epidermis. While changes in the anatomy of the mesophyll cells can cause modifications in transpiration due to evaporation of water from the intercellular spaces and increase in the mesophyll resistance, it also may represent an adaptation to reduced water availability. Diminished proximity increases the cell surface contact and facilitate the capture of light energy and gaseous elements, which are necessary for the photosynthetic process. On the other hand ticker abaxial epidermis may diminish water vapor loss through cuticle transpiration.

So far we have demonstrated increased drought resistance in DREB transgenic plants under laboratory and greenhouse conditions as for several crops (Dubouzet *et al*., 2003). However very little is known about DREB plants performance under field conditions (Xiao *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010 and Saint Pierre *et al*., 2012).

The success of any selection strategy would ultimately be determined by the reproductive success, thus by the final yield (Saint Pierre *et al*., 2012). As stated earlier, testing DREB plants in the field is particularly important, considering that few studies have reported results from genetically modified grown in realistic field environmental conditions (Saint Pierre *et al*., 2012 and Passioura, 2012). Field performance of P58 and 09D-0077 plants was evaluated under three different water regimes; irrigated, natural drought and under stress simulated by sheltering the plants from rain at the vegetative or reproductive stages (Fig. 14 and 15).

The drought treatments affected the plant´s productivity as well as its growth and yield components. Under water deficit at the vegetative or reproductive stages main effects of the *DREB1A* gene was resulted from changes in the height of the plants due to a shortening of its internode at least at the initial stages of the crop in the field. However from the Fig. 14 it can be seen that there was no significant differences on the growth components of the plants of the line P58 and the crossing 09D-0077 at the field conditions.

Regarding to the yield components (Fig. 15) no significant differences were found among the genotypes, except for the number of nodes which was higher for the P58 line in the NI treatment and for the crossing 09D-0077 with the water stress at the vegetative stage.

Although the DREB plants did not outperform its isoline the cultivar BR16 in terms of yield, there was a clear tendency of superiority for some yield components such as number of seeds and total number of pods when stress was applied at the vegetative stage. Saint Pierre *et al*. (2012) working with DREB1A plants of wheat found that the plants did not generally outperformed the controls in terms of grain yield under water deficit. Yet, according to his studies, events selected for WUE in the greenhouse were identified as lines that combined an acceptable yield—even higher yield under well irrigated conditions —and stable performance across the different environments generated by the experimental drought treatment. The positive association between WUE and total biomass suggests that an increase in grain yield is possible through increasing WUE in transgenic plants, assuming that HI is maintained (Wright, 1996 and Saint Pierre *et al*., 2012)

In summary, it appeared that the acquirement of the drought tolerance in the plants of the transgenic lines was not at the cost of growth and yield. Therefore further studies are

needed to better characterize the conditions (soil and atmosphere) in which these plants may outperform the non transformed parental as plant responses to drought are influenced by the time, intensity, duration and frequency of the stress, plant developmental stage and by a diverse plant-soil-atmosphere interactions (Saint Pierre *et al*., 2012).

In addition, drought tolerance of DREB plants may involve water conservation mechanisms when water is available to supply fully the plant´s demand and this may be a consequence of DREB1A gene expression under well watered conditions. However, more insights into the mechanisms of stress tolerance both under greenhouse and field conditions as well as the identification of other physiological traits linked to drought tolerance is been sought in our on-going studies.

5.6 Acknowledgments

This work was supported by the Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan International Cooperation Agency, Japan Science and Technology Agency, Brazilian Agricultural Research Corporation, CAPES, Londrina State University (UEL)/ Brazil.

5.7 References

ARAGÃO, F. J. L.;SAROKIN, L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing an herbicidal molecule results in recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merril] plants at a high frequency. **Theoretical Applied Genetics,** v.101, p.1-6, 2000.

BEHNAM, B.; KIKUCHI, A.; CELEBI-TOPRAK, F.; YAMANAKA, S.; KASUGA, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; WATANABE, K. N. The Arabidopsis *DREB1A* gene driven by the stress-inducible rd29A promoter increases salt-stress tolerance in proportion to its copy number in tetrasomic tetraploid potato (*Solanum tuberosum*). **Plant Biotechnology**, v.23, p.169–177, 2006.

BENEVENTI, MA. **Transformação genética em soja pela inserção da construção gênica contendo a região promotora do gene rd29A e a região codante do gene DREB1A de *Arabidopsis thaliana*, visando tolerância à seca**. Master's thesis, Londrina State University, 2006.

BEHNAM, B.; KIKUCHI, A.; CELEBI-TOPRAK, F.; KASUGA, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; WATANABE, K. N. *Arabidopsis* rd29A:DREB1A enhances freezing tolerance in transgenic potato. **Plant Cell Report**, v.26, n.8, p.1275–1282, 2007.

BHATNAGAR-MATHUR, P.; DEVI, M. J.; SERRA, J. R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; VADEZ, V.; SHARMA, K. K. Evaluation of transgenic groundnut lines under water limited conditions. **International Arachis Newsletter**, v.24, p.33–34, 2004.

BHATNAGAR-MATHUR, D. S.; REDDY, M.; LAVANYA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHARMA, K. Stress-inducible expression of *Arabidopsis thaliana* DREB1A in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) increases transpiration efficiency under water-limiting conditions. **Plant Cell Report**, v.26, p.2071–2082, 2007.

BLUM, A. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? **Australian Journal of Agricultural Research** v.56, p.1159–1168, 2005.

CRUSIOL, L. G. T.; CARVALHO, J. F. C.; FARIAS, J. R. B. Análise da disponibilidade hídrica na fazenda da Embrapa Soja (Londrina, PR) nas safras de 2009/2010, 2010/2011 e 2011/2012, p.99-107, 2012.

DUBOUZET, J. G.; SAKUMA, Y.; ITO, Y.; KASUGA, M.; DUBOUZET, E. D.; MIURA, S.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Os-DREB genes in rice, *Oryza sativa L.;* encoded transcription activators that function in drought, high-salt and cold-responsive gene expression. **Plant Journal,** v.33, p.751-763, 2003.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PERNNIGTON, J. S. Stage of development description for soybeans [Glycine max (L.) Merrill]. **Crop Science**, v.11, p.929-93, 1971.

FLEXAS, J.; BOTA, J.; LORETO, F.; CORNIC, G.; SHARKEY, T. D. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. **Plant Biology**, v.6, p.269-279, 2004.

GAO, S. Q.; CHEN, M.; XIA, L. Q.; XIU, H. J.; XU, Z. S.; LI, L. C.; ZHAO, C. P.; CHENG, X. G.; MA, Y. Z. A cotton (*Gossypium hirsutum*) DRE binding transcription factor gene, GhDREB, confers enhanced tolerance to drought, high salt, and freezing stresses in transgenic wheat. **Plant Cell Reports,** v.28, p.301–311, 2009.

HUFSTETLER, E. V.; BOERMA, H. R.; CARTER, T. E.; EARL, H. J. Genotypic variation for three physiological traits affecting drought tolerance in soybean. **Crop Science**, v.47, p.25-35, 2007.

KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress inducible transcription factor**. Nature Biotechnology**, v.17, p.287–291, 1999.

KASUGA, M.; MIURA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. A. Combination of the *Arabidopsis* DREB1A Gene and Stress-Inducible *rd29A* Promoter Improved Drought- and Low- Temperature Stress Tolerance in Tobacco by Gene Transfer. **Plant Cell Physiology**, v.45, p.346– 350, 2004

LI, X. P.; TIAN, A. G.; LUO, G. Z.; GONG, Z. Z.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses. **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.1355–1362, 2005.

LIVAK, K. J. and SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LOPATO, S.; & LANGRIDGE, P. Engineering Stress Tolerance in Cereals Using *DREB/CBF* Genes: Outcomes, Problems and Perspectives. **ISB News Report,** 2011.

MORRAN, S.; EINI, O.; PYVORENKO, T.; PARENT, B.; SINGH, R.; ISMAGUL.; ELIBY, S.; SHIRLEY, N.; LANGRIDGE, P.; LOPATO, S. Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. Plant Biotecnology Journal, v.9, p.230-249, 2010.

OH, S. J.; SONG, S. I.; KIM, Y. S.; JANG, H. J.; KIM, S. Y.; KIM, M.; KIM, Y. K.; NAHM, B. H.; KIM, J. K. Arabidopsis thaliana CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. **Plant Physiology**, v.138, p.341–351, 2005.

OLSEN, A. N.; ERNST, H. A.; LEGGIO, L. L. & SKRIVER, K. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. **Trends Plant Science,** v.10, p.79–87, 2005.

PASSIOURA, J. B. Phenotyping for drought tolerance in grain crops: when is it useful to breeders? **Functional Plant Biology,** v.39, p.851–859, 2012.

PELLEGRINESCHI, A.; NOGUERA, L. M.; SKOVMAND, S.; BRITO, R. M.; VELAZQUEZ, L.; HERNANDEZ, R.; WARBURTON, M. & HOISINGTON, D. Identification of highly transformable wheat genotypes for mass production of fertile transgenic plants. **Genome,** v.45, p.421–430, 2002.

PELLEGRINESCHI, A.; REYNOLDS, M.; PACHECO, M.; BRITO, R. M.; ALMERAYA, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; HOISINGTON, D. Stress-induced expression in wheat of the Arabidopsis thaliana DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. **Genome**, v.47, p.493–500, 2004.

PINTO, R. S.; REYNOLDS, M. P.; MATHEWS, K. L.; MCINTYRE, C. L.; OLIVARES-VILLEGAS, J. J.; CHAPMAN, S. C. Heat and drought adaptive QTL in a wheat population designed to minimize confounding agronomic effects. **Theoretical and Applied Genetics**, v.121, p.1001–1021, 2010.

POLIZEL, A.; MEDRI, M. E.; NAKASHIMA, K.; YAMANAKA, N.; FARIAS, J. R.; OLIVEIRA, M. C. N.; MARIN, S. R. R.; ABDELNOOR, R. V.; MARCELINO-GUIMARAES, F. C.; FUGANTI, R.; RODRIGUES, F.A.; STOLF, R.; BENEVENTI, M. A.; ROLLA, A. A. P.; NEUMAIER, N.; YAMAGUCHI- SHINOZAKI, K.; CARVALHO, J. F. C.; NEPOMUCENO, A. L. Molecular, anatomical and physiological properties of a genetically modified soybean line transformed with rd29A:AtDREB1A for the improvement of drought tolerance. **Genetics and Molecular Research**, v.10, 2011.

RAY, J. D.; SINCLAIR, T. R. Stomatal closure of maize hybrids in response to soil drying. **Crop Science,** v.37, p.803-807, 1997.

RECH, E. L.; VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nature Protocols**, v.3, p.1-10, 2008.

RICHARDS, R. A. Crop improvement for temperate Australia - future opportunities. **Field Crops Research**, v.26, p.141–169, 1991.

SAINT PIERRE, C.; CROSSA, J. L.; BONNETT, D.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; REYNOLDS, M. P. Phenotyping transgenic wheat for drought resistance. **Journal of Experimental Botany,** v.63, p.1799–1808, 2012.

SALINET, L. H. 2009. Avaliação fisiológica e agronômica de soja geneticamente modificada para maior tolerância à seca. Master's thesis, Luiz de Queiroz College of Agriculture.

STOLF-MOREIRA, R.; LEMOS, E. G. M.; ABDELNOOR, R. V.; BENEVENTI, M. A.; ROLLA, A. A. P.; PEREIRA, S. S.; OLIVEIRA, M. C. N.; NEPOMUCENO, A. L.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C. Identification of reference genes for expression analysis by real-time quantitative PCR in drought-stressed soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.1, p.58-65, 2011.

THORNTHWAITE, C. W.; MATHER, J. R. The water balance. Centerton, NJ: Drexel Institute of Technology - Laboratory of Climatology, 104p, 1995.

QIN, F.; SAKUMA, Y.; LI, J.; LIU, Q.; LI, Y.Q.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays L*. **Plant and Cell Physiology**, v.45, p.1042–1052, 2004.

VADEZ, V.; SINCLAIR, T. R. Leaf ureide degradation and N_2 fixation tolerance to water deficit in soybean. **Journal of Experimental Botany,** v.52, 153-159, 2001.

VADEZ, V.; RAO, S.; SHARMA, K. K.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; DEVI, J. M. DREB1A allows for more water uptake in groundnut by a large modification in the root / shoot ratio under water deficit. **International Arachis Newsletter**, v.27, p.27–31, 2007.

XIAO, B.; CHEN, X.; XIANG, C.; TANG, N.; ZHANG, Q.; XIONG, L. Evaluation of seven function-known candidate genes for their effects on improving drought resistance of transgenic rice under field conditions. **Molecular Plant,** v.2, p.73–83, 2009.

YANG, S.; VANDERBELD, B.; WAN, J.; HUANG, Y. Narrowing down the targets: towards successful genetic engineering of drought tolerant crops. **Molecular Plant**, v.3, p.469–490, 2010.

WRIGHT, G. Review of ACIAR selection for water use efficiency in legumes project recommends further research. **ACIAR Food Legume Newsletter**, p.2–3, 1996.

Figures



Fig. 1. Detailed image of the greenhouse experiments using 3 Kg (a) and (1kg b) pots

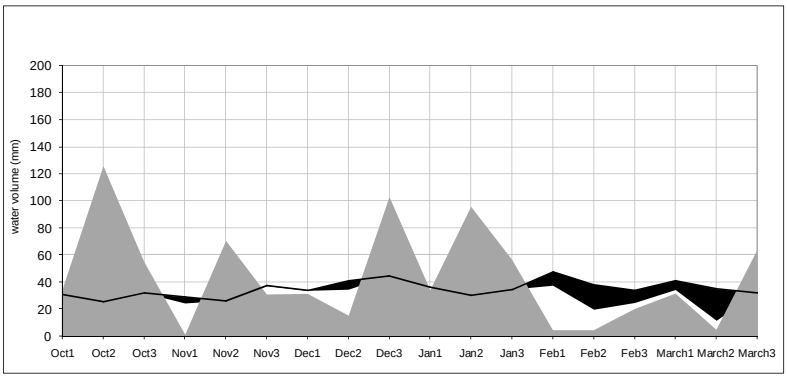


Fig. 2. Water balance calculated according to Thornthwaite e Mather (1955). Water deficit occurred at several periods during the 2011/2012 season (black area) including at the pod filling stage

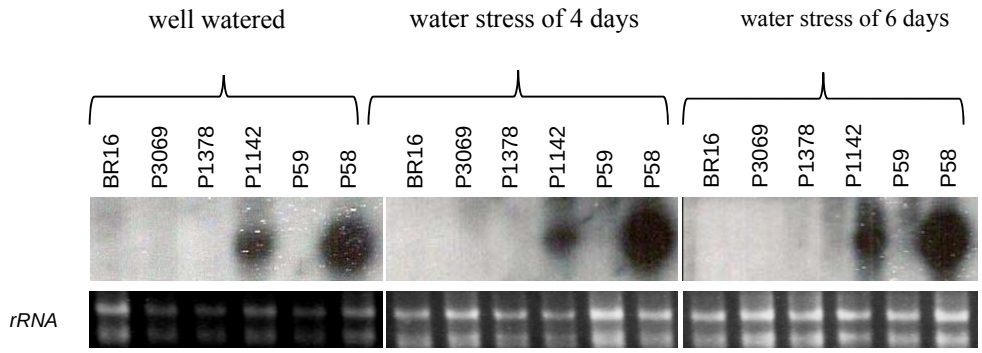


Fig. 3. Northern blot analysis of the DREB1A lines



Fig. 4. Survival rate of DREB plants (lines P58, P1142) and BR 16 after 6 days of water stress and 3 days of re-irrigation (n=10).

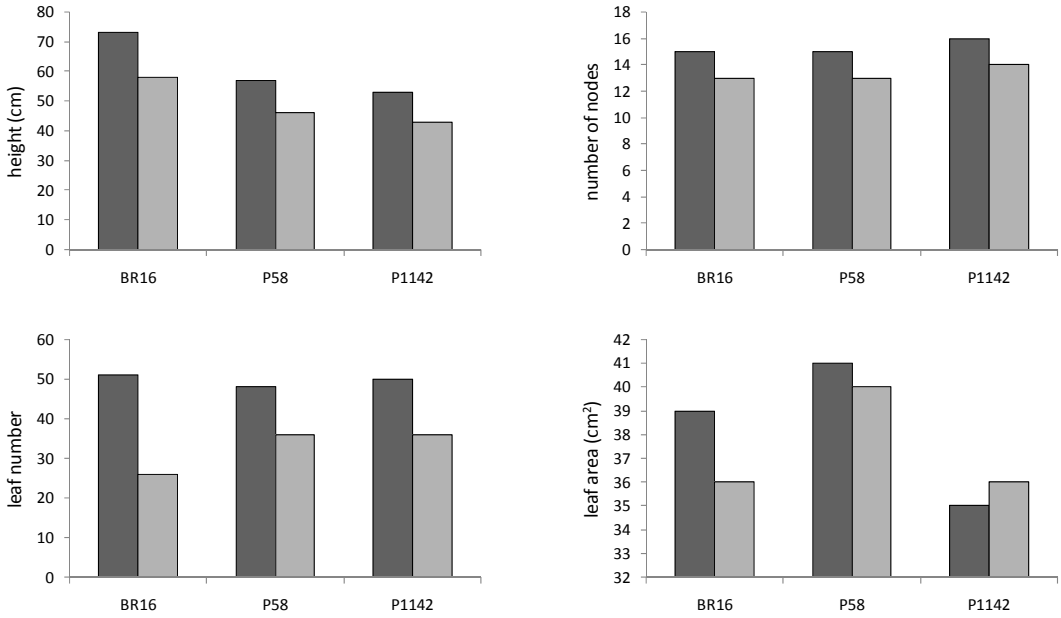


Fig. 5. Growth characteristics of the *AtDREB1A* plants and the cultivar BR16 under control (C-dark bars) and moderate water stress (DS-grey bars) in greenhouse conditions. Differences were not statistically significant (Duncan 5%) (n=6).

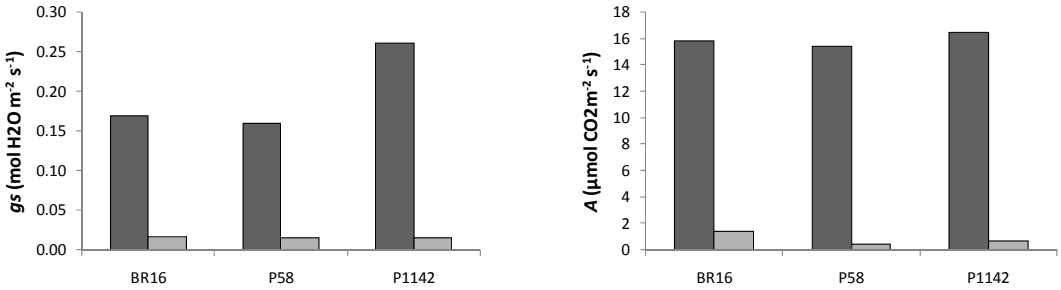


Fig. 6. *A* and *gs* of *AtDREB1A* plants and the cultivar BR16 under severe water stress in greenhouse conditions. Differences were not statistically significant (Duncan 5%) (n=6).



Fig. 7. *AtDREB1A* plants and the cultivar BR16 under moderate (a) and severe (b) water stress at greenhouse conditions. It can be noticed that differently from the BR 16 plants, the DREB1A plants did not show any symptoms of drought under moderate water stress. Under severe water stress wilting symptoms were similar in plants of the P58 line and the BR 16 cultivar.

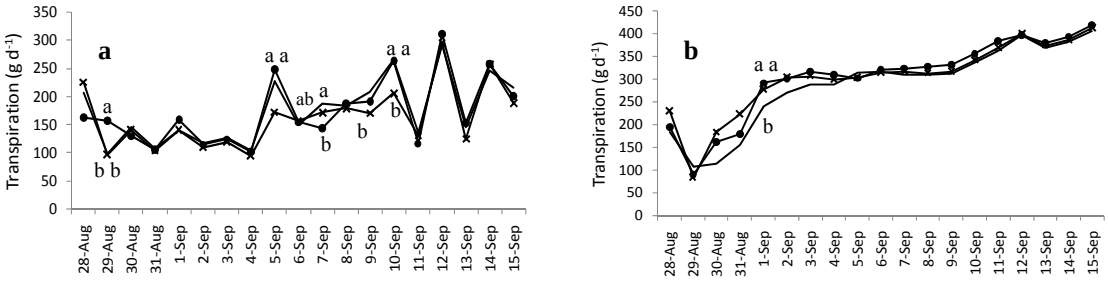


Fig. 8. Transpiration of *AtDREB1A* plants and the cultivar BR16 under control conditions (a) and water stress (b). Line with x marker-P58; continuous line-P58, line with circle marker-BR16. Days with different letters showed significance at 5% (Duncan) (n=6).

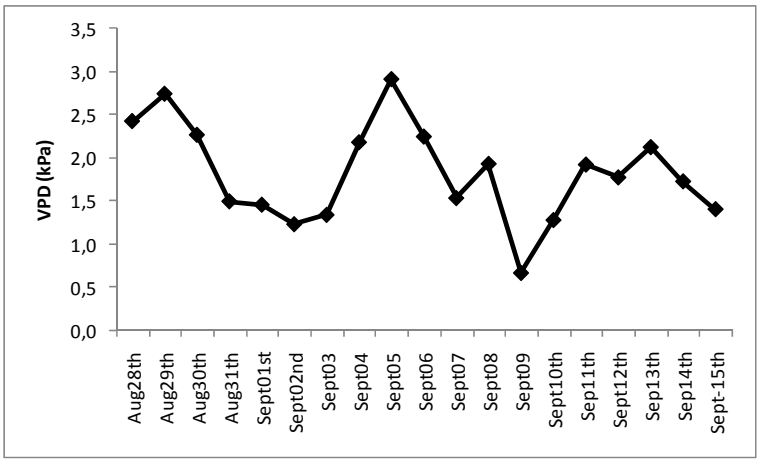


Fig. 9. Vapor pressure (kPa) deficit at the greenhouse.

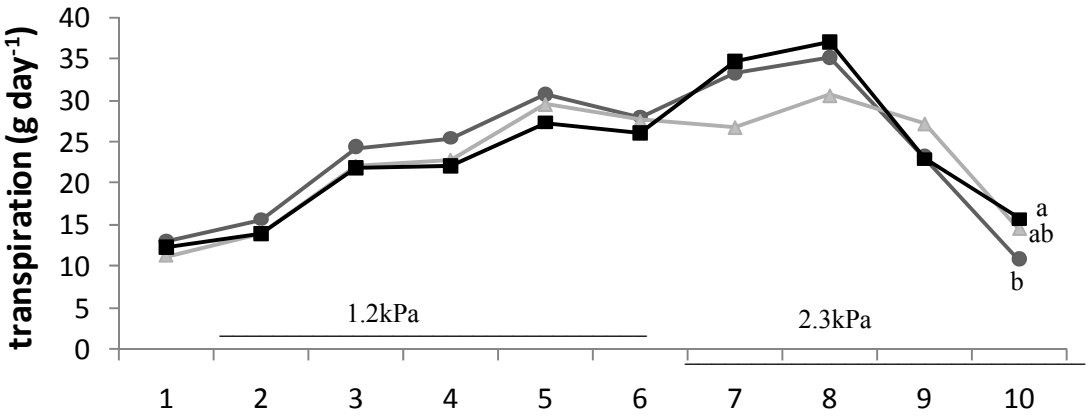


Fig. 10. Transpiration of *AtDREB1A* plants and the cultivar BR16 under control (1-6 days) and water stress (7-10 days) conditions in fitotron. Line with a circle-BR 16, line with a square-P1142, line with a triangle-P58. Different letters showed significance at 5% (Duncan) (n=6).

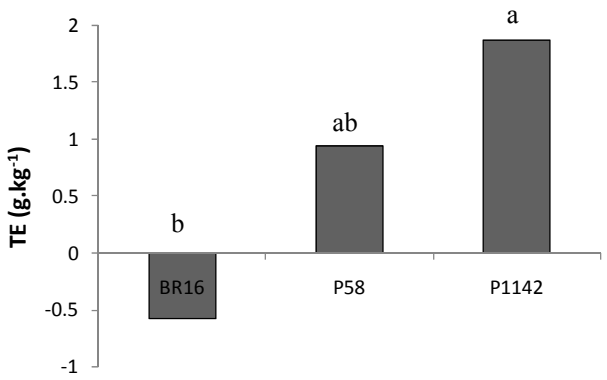


Fig. 11. Transpiration efficiency of *AtDREB1A* plants and the cultivar BR16 under water stress condition in the fitotron. Different letters showed significance at 5% (Duncan) (n=10).

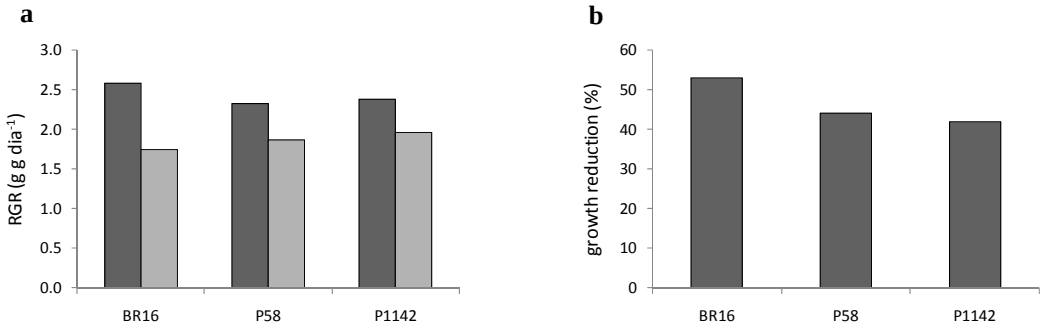


Fig. 12. Relative growth ratio and percentage of growth reduction of *AtDREB1A* plants and the cultivar BR16 in greenhouse conditions. Color of the bars represents dark grey=control and light grey=water stress Differences were not statistically significant (Duncan 5%) (n=6).



Fig. 13. (a) Figure showing the experiment at the field conditions and the rain out shelters (b) Figure showing the slow wilting behavior of plants of the line P58 (DREB1) at field conditions

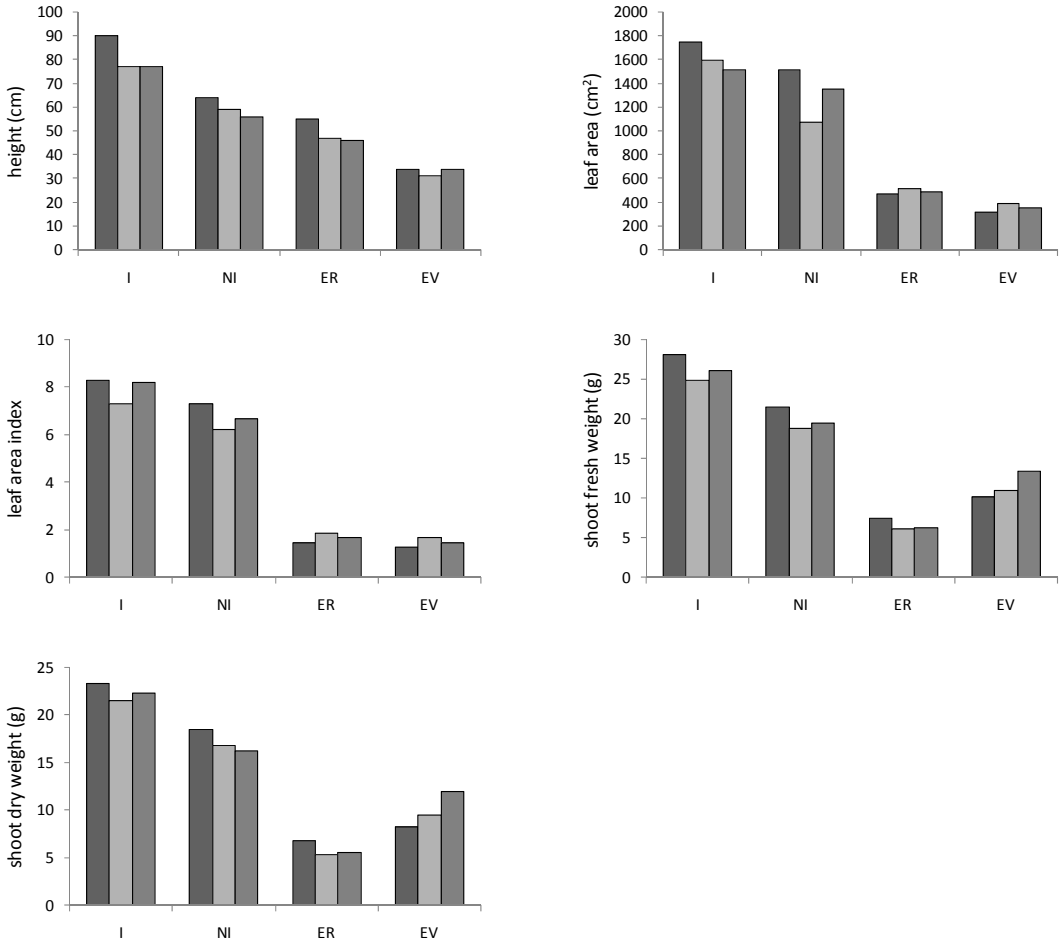


Fig. 14. Growth components of *AtDREB1A* plants and the cultivar BR16. The bars in each treatment represents BR16, P58 and 09D-0077 respectively from left to the right. I-irrigated, NI-non irrigated or natural drought, ER-water stress at the reproductive stage, EV-water stress at the vegetative stage. Differences were not statistically significant (Duncan 5%).

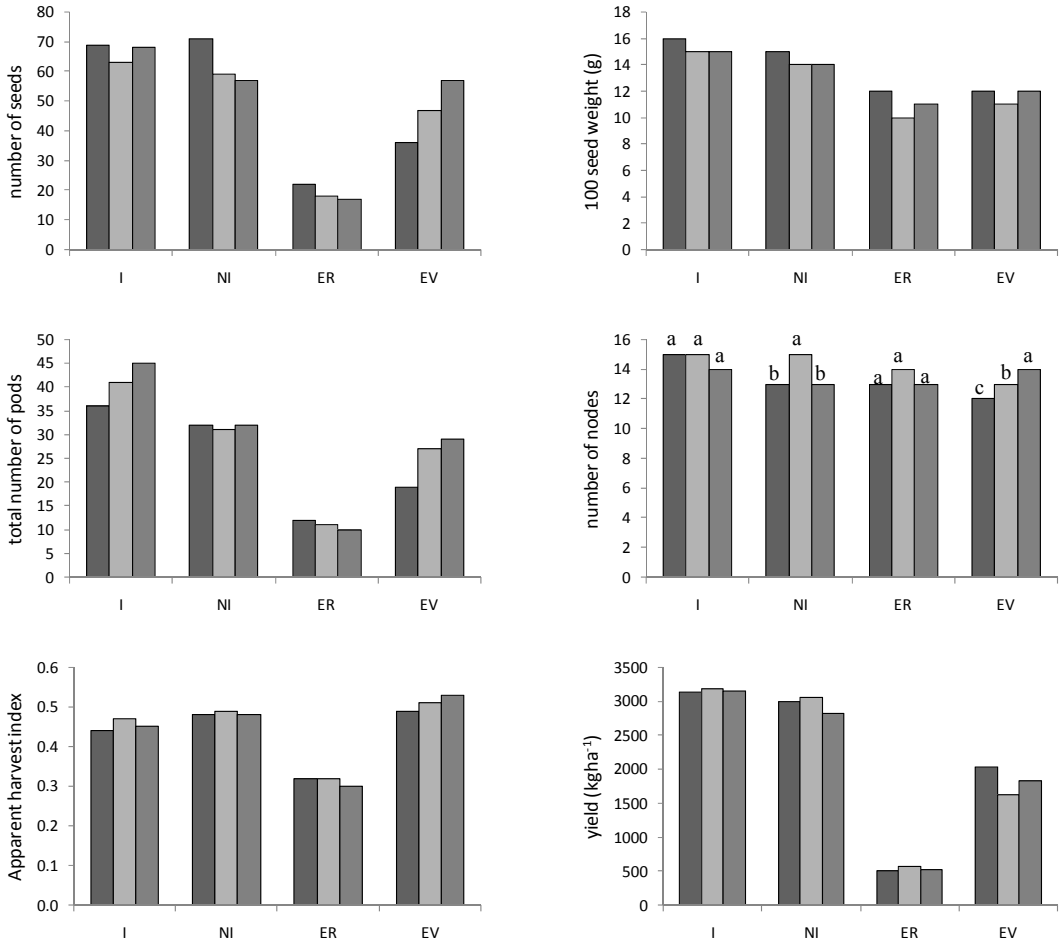


Fig. 15. Yield components of *AtDREB1A* plants and the cultivar BR16. The bars in each treatment represents BR16, P58 and 09D-0077 respectively from left to the right. I-irrigated, NI-non irrigated or natural drought, ER-water stress at the reproductive stage, EV-water stress at the vegetative stage. Data (bars) without letters show are not statistic significance at 5% by the Duncan test.

CAPÍTULO 2

6 Caracterização do transcriptoma de linhagens de soja geneticamente modificadas (rd29A:AtDREB1A) e identificação de genes regulados pelo fator de transcrição AtDREB1A

6.1 Resumo

Dentre os fatores que interferem na produtividade da soja, a seca pode provocar severos danos à planta e acarretar acentuada queda na produção final. Os mecanismos de tolerância à seca envolvem um grande número de genes, e apresentam grande complexidade de sinalização molecular, que resulta na aclimatação e adaptação vegetal. Os genes que contém em sua região promotora o elemento *cis*-atuante DRE, estão, normalmente, sujeitos à regulação pelo fator de transcrição *DREB1A*. Este FT está presente na via ABA-independente de resposta a estresses abióticos, desencadeando a ativação de genes de defesa celular. Neste contexto, no presente trabalho foram identificados genes possivelmente regulados por *AtDREB1A.* Um experimento de microarranjos foi realizado com as linhagens de soja GMs P58 e P1142, transformadas com a construção gênica *rd29A:AtDREB1A,* submetidas a ótimas condições de crescimento. Um total de 1.475 transcritos diferencialmente expressos foram identificados na linhagem P58 e, 311 na linhagem P1142. A categorização funcional identificou 25 e 29 termos GO na linhagem P1142 e P58, respectivamente. Mesmo em condições de disponibilidade de água, diversas vias metabólicas ativadas foram identificadas em ambas linhagens GMs, como vias do metabolismo secundário, genes relacionados a parede celular, fatores de transcrição, proteínas de choque térmicos dentre outras. A busca pelo *motif* DRE, na região promotora dos genes diferencialmente expressos, indicou a presença da sequência core desse *cis*-elemento em 208 genes identificados na linhagem P58, e em 35 genes da linhagem P1142. Dezesseis genes foram identificados como diferencialmente expressos para ambos os eventos GMs e na região promotora destes, pelo menos, um elemento DRE foi observado. O perfil de expressão mostrou que deste total, 9 genes apresentaram perfil de expressão induzido e 3 com perfil reprimido, para as duas linhagens. Apenas 4 genes, dos 16 em comum identificados, apresentaram perfil de expressão discrepante quando comparadas as duas linhagens. Esses genes já foram descritos como envolvidos em vias metabólicas de sinalização por hormônios, vias de estresses abióticos e bióticos, metabolismo secundário, proteínas de choque térmico dentre outras, sendo fortes

candidatos para estudos futuros de validação da ativação e regulação da expressão pelo fator de transcrição *DREB1A*.

Palavras – chave: DREB1A, déficit hídrico, fator de transcrição, *Glycine max*.

6.2 Introdução

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merril) possui grande importância na agricultura e na economia mundial, entretanto, constantes oscilações climáticas podem prejudicar sua posição de destaque neste cenário. Fatores abióticos, como salinidade, o déficit hídrico e a baixa temperatura (MATSUKURA et al., 2010) podem provocar reduções significativas na quantidade e qualidade da produção final, reduzindo consideravelmente os lucros dos produtores (MANAVALAN et al., 2009).

Para aumentar a tolerância e sobreviver a condições ambientais adversas, as plantas respondem ativando vários processos bioquímicos e fisiológicos. Estes mecanismos de resposta vegetal ao estresse variam em função da intensidade e duração do mesmo, bem como, da fase de desenvolvimento em que ocorrem. Estas alterações e modificações de adaptação afetam a condutância estomática, processos bioquímicos tais como atividade enzimática, respiração celular, acúmulo de osmólitos e síntese de proteínas envolvidas no processo de tolerância ao estresse são alterados (KASUGA et al., 1999; SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

Muitas estratégias de manejo, irrigação e controle de pragas podem ser utilizadas para minimizar as consequências da seca nas lavouras, no entanto, o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes é uma alternativa promissora, atrativa e viável, principalmente porque o cenário atual de mudanças climáticas prevê para um futuro próximo, aumento em intensidade e frequência de déficit hídrico. Neste contexto, uma maior compreensão dos mecanismos moleculares, bioquímicos e fisiológicos responsáveis pela tolerância vegetal a restrição de água é indispensável para o delineamento de métodos e estratégias desenvolvidas nos programas de melhoramento (MANAVALAN et al., 2009).

A expressão de inúmeros genes vegetais está diretamente regulada pelos estresses abióticos, e a nível transcricional, essa regulação pode ser classificada em dois grupos: A) genes responsáveis pela proteção celular contra a desidratação como as enzimas necessárias para o processo de biossíntese de vários osmoprotetores, as proteínas LEA (*Late Embriogenesis Abundant – embriogênese tardia abundante*), as chaperonas, as proteínas de

canal de água (aquaporinas), a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e várias proteases; e B) genes envolvidos na regulação da transdução de sinais moleculares que ativam os genes do grupo A, como os microRNAs, os fatores de transcrição e famílias de enzimas kinases e fosfatases (MARUYAMA et al., 2004; SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; MSANNE et al., 2011).

Os fatores de transcrição (FT) têm sido extensivamente estudados, pois desempenham um papel importante na regulação da expressão gênica vegetal em resposta a estresses abióticos (NAKASHIMA et al., 2009) direcionando a expressão de outros genes, de forma cooperativa ou independente (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007), resultando em respostas fisiológicas, anatômicas e bioquímicas da planta as condições ambientais adversas (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006).

Importantes elementos *cis*-atuantes foram identificados na região promotora de genes responsivos ao estresse hídrico. Esses elementos *cis*-atuantes são sítio-específicos para a ligação de FTs responsáveis pela regulação, ativação ou repressão de inúmeros genes que conferem tolerância a estresses abióticos (AGARWALL e JHA, 2010). Especificamente, a presença de uma sequência conservada de 9 pb denominada DRE (*Dehydration Response Element – Elemento de resposta à desidratação*), na região promotora de genes estresse–responsivos, classifica-os como potenciais candidatos à regulação pelo fator de transcrição DREB (*Dehydration Response Element Binding– Elemento de ligação responsivo à desidratação*), um importante FT responsivo a estresses abióticos. A família DRE está presente na via ABA-independente de reposta a condições ambientais adversas, induzindo e regulando a expressão de uma série de genes responsáveis pela ativação de mecanismos de defesa celular (LATA e PRASAD, 2011).

O *motif* DRE já foi identificado na região promotora de muitos genes ativados em respostas à seca e estresse por baixas temperaturas. Em *Arabidopsis thaliana*, um estudo de microarranjo identificou genes *downstream* regulados pela família DREB que apresentaram em sua região promotora a sequência DRE (MARUYAMA et al., 2004; ZHAO et al., 2008; MARUYAMA et al., 2012). O FT DREB, que se liga ao elemento *cis*-atuante DRE, parece ser extremamente conservado entre as espécies vegetais, pois a introdução do fator de transcrição *DREB1A*, sob o controle do promotor estresse induzido *rd29A*, em *Arabidopsis* (Liu et al., 1998; JAGLO-OTTONSEN et al., 1998; GILMOUR et al., 1998), tabaco (KASUGA et al., 2004), arroz (DUBOUZET et al., 2003; OH et al., 2005; ITO et al., 2006), milho (QIN et al., 2004; 2007), soja (POLIZEL et al., 2011) e trigo (PELLEGRINESCHI et al., 2004) resultou em um aumento da tolerância à seca, a salinidade e ao frio nessas espécies.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi identificar genes potencialmente regulados pelo FT *AtDREB1A*, em linhagens de soja GMs. Para tal, microarranjos gerados a partir do transcriptoma de soja foram hibridizados com mRNA de plantas de soja contendo a construção gênica *rd29A*:*At*DREB1A em condições normais (não estressado) uma vez que, a expressão gênica basal do promotor *rd29A* já havia sido identificada nesta condição por Beneventi (2006). Após a identificação de genes diferencialmente expressos, foi realizada uma busca pelo elemento *cis* DRE na região promotora destes genes. A presença deste *motif* classifica estes genes como candidatos a regulação pelo fator de transcrição *AtDREB1A*.

6.3 Material e Métodos

6.3.1 Condições de crescimento e obtenção do material biológico

As linhagens de soja geneticamente modificadas (GMs), P58, P59, P1142, P1378 e P3069 utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir da transformação via biobalística de embriões da cultivar BR 16 (OYA et al., 2004), considerada sensível à seca, com a construção gênica *rd29*:*At*DREB1A (BENEVENTI, 2006; MARTINS et al., 2007). Esta construção contém o promotor estresse induzido *rd29A*, a região codante do fator de transcrição *AtDREB1A,* isolado de *A. thaliana* e a região terminadora Nos. O gene *rd29A* foi identificado como responsivo a seca, salinidade e ao frio, por Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki (1993).

Um experimento com as linhagens transgênicas e com a cultivar BR 16 (controle) foi conduzido em casa de vegetação, em um delineamento inteiramente casualizado, com triplicata biológica, totalizando 18 plantas. Durante 20 dias as plantas cresceram em condições controladas de temperatura a 28°C, com fotoperíodo de 12h luz/escuro. Duas vezes por semana, as plantas foram irrigadas com solução de Hoagland contendo macro e micro nutrientes necessários para o desenvolvimento vegetal. No estádio de desenvolvimento V_4 as plantas de soja GMs e a cultivar BR 16 (controle) foram submetidas ao tratamento de déficit hídrico, com controle da umidade do solo:vermiculita (1:1). Aos 4 e 6 dias após a início do tratamento, amostras de folhas coletadas e armazenadas em ultrafreezer a -80°C. O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIZOL (*Invitrogen-Life Technologies*) conforme recomendações do fabricante. Este material foi utilizado para a realização das técnicas de *Northern blot* e Microarranjo.

As amostras foliares de plantas cultivadas em potes de PVC preenchidos com solo e vermiculita (1:1) foram coletadas a fim de extrair DNA (DOYLE e DOYLE, 1987), para análises de *Southern blot*.

6.3.2. Análise da expressão do transgene AtDREB1A nas linhagens de soja GMs e na cultivar BR16 através de *Northern blot*

Para a realização do *Northern blot*, 10 μg de RNA total das amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose 1% com formaldeído por aproximadamente 2h. A seguir, as amostras foram transferidas para membrana *Amersham HybondTM-N+* (GE Healthcare). A sonda para hibridização foi preparada utilizando-se o produto de purificação de uma reação de PCR realizada com *primers* específicos que amplificam a sequência do gene alvo, *AtDREB1A* e a marcação foi realizada com [a^{32}P]d-CTP. Sonda e membrana foram hibridizadas por 16h a 42ºC, e transcorrido este período, as membranas foram lavadas em uma série de tampões específicos (1 x SSC / 0,1 % SDS; 0,1 x SSC / 0,1% SDS) para retirada do excesso de sonda. Logo após as membranas foram colocadas para exposição em filme fotográfico *Kodak BioMax.*

6.3.3 Análise do número de cópias inseridas do transgene AtDREB1A nas linhagens de soja GMs através de *Southern blot*

Foram utilizados cerca de 10 μg/μL de DNA de tecido foliar das plantas. O DNA das amostras foi digerido com a enzima de restrição *Eco*RI (50U/uL) e os fragmentos separados em gel de agarose a 0,8%. Em seguida foi realizada a transferência das amostras para a membrana. O preparo da sonda foi realizado utilizando-se o produto de purificação de uma reação de PCR realizada com *primers* específicos que amplificam a sequência do gene alvo *AtDREB1A*. A sonda foi marcada com [a^{32}P]d-CTP. Após a hibridização, as membranas foram lavadas com tampões específicos (1 x SSC / 0,1 % SDS; 0,1 x SSC / 0,1% SDS), e colocadas para exposição em filme fotográfico *Kodak BioMax.*

6.3.4 Obtenção dos perfis de expressão por Microarranjos

RNA total das linhagens de soja GMs P58 e P1142 foi extraído e utilizado para a obtenção de moléculas alvo de cDNA marcados com os fluoróforos "*Cy5*" e "*Cy3*". Duas

marcações foram realizadas sendo que Marcação 1 foi realizada utilizando-se a linhagem GM P58 marcada com "*Cy5*" e linhagem controle não transgênica BR 16 marcada com "*Cy3*" e, a Marcação 2, utilizando a linhagem GM P1142 marcada com "*Cy5*" e BR 16 não transgênica marcada com "*Cy3*". As amostras em condições controle (não estressado) foram hibridizadas com o arranjo "*Agilent Soybean* oligomicroarray" de biochip 60 Kb de oligos (*Agilent Technologies* Inc., Santa Clara, CA, USA). Os microarranjos foram escaneados no *Agilent Microarray Scanner* (*Agilent Technologies* Inc., Santa Clara, CA, USA), as imagens geradas analisadas quanto à qualidade, e a remoção do *background* foi feita através do software *Agilent Feature Extraction* (*Agilent Technologies* Inc., Santa Clara, CA, USA). O resultado gerado pelo software *Agilent Feature Extraction* foi importado para o *GeneSprin*g GX11.0 para posterior análise das sondas, cálculos de *fold-change* e e-valeu. Somente foram considerados transcritos diferenciais, aqueles que apresentaram confiança ao nível de significância de 5% (e-valeu≤0,05) e com *fold-change* ≤ -2 ou ≥2.

O programa *Treeview* (SALDANHA, 2004) foi utilizado para a visualização dos *Heatmaps* (mapas de expressão).

6.3.5 Análises *in silico*

6.3.5.1 Identificação dos genes diferencialmente expressos e anotação dos modelos gênicos

Os genes identificados como diferencialmente expressos no microarranjo tiveram sua anotação e termos GO (Gene Ontology) associados de acordo com as informações disponíveis no banco de dados SoyBase (http://soybase.org/). Para complementar as anotações, e também realizar as análises automáticas para a distribuição dos genes diferenciais em categorias funcionais, foi empregado o programa Blast2Go. Essa última análise foi realizada somente para modelos gênicos, dos quais suas sequências (cDNA) estavam disponíveis no banco de dados do genoma da soja (http://www.phytozome.net/). Posteriormente, a ferramenta *Mapman* (THIMM et al., 2004) foi empregada para análises mais detalhada de vias metabólicas, já descritas na literatura, como envolvidas na resposta vegetal a estresses abióticos.

6.3.5.2. Análise da região montante dos genes diferencialmente expressos para identificação de *cis*-elemento DRE.

Para a triagem de genes de interesse, e posterior análise da região promotora, foram considerados apenas aqueles diferencialmente expressos em ambas as linhagens GMs, e em que, pelo menos, um elemento DRE tenha sido observado na região promotora dos mesmos. Para a identificação dos elementos DRE, e outros *cis*-elementos, uma sequência de 1000 pb montante dos genes de interesse foi submetida à análises pelos programas PlantCare (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/), PLACE (http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalup.html) e MEME (*Multiple EM for Motif* Elicitation, BAILEY e ELKAN, 1994) (http://meme.sdsc.edu/meme/cgi-bin/meme.cgi) e Genomatix/Matinspector (http://www.genomatix.de/).

6.4 Resultados e Discussão

6.4.1 Análise de expressão do transgene nas linhagens de soja e seleção para o microarranjo

Para a seleção das linhagens GMs a serem utilizadas nas análises de microarranjo, utilizou-se dados de *Northern blot,* citado anteriormente, das 5 linhagens GMs, a fim de, verificar o nível de expressão da construção introduzida no genoma da soja. O resultado indicou que as linhagens P58 e P1142 apresentaram maior nível de expressão do transgene em ambos os tratamentos, controle (não estressado) e estresse aos 4 e 6 dias após a imposição da restrição hídrica (Fig. 01). Para as linhagens GMs de soja P59, P1378 e P3069 não foi detectada expressão gênica em nenhum dos tratamentos aplicados.

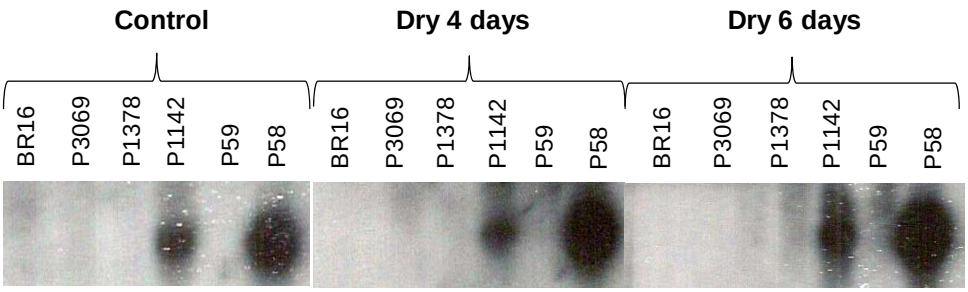


Fig. 1: *Northern blot* indicando a expressão do gene *AtDREB1A* nas linhagens de soja GMs P58, P1142, P59, P1142 e P3069 e na cultivar controle não transgênica BR 16, nos tempos de tratamento controle e estressado aos 4 e 6 dias de estresse de déficit hídrico.

A expressão gênica do fator de transcrição (FT) *DREB1A* detectada nas plantas controle indica como já relatado na literatura, que promotores estresse induzidos como o rd29 podem "vazar" mesmo em condições não estressadas. Kasuga et al. (1999) verificaram a expressão dos genes *DREB1A* e *rd29A* em *Arabidopsis thaliana* transformadas com a construção *rd29A*:DREB1A, submetidas à seca, ao frio, à alta salinidade e ao tratamento com ABA. Neste trabalho, as plantas apresentaram um baixo nível de expressão do transgene em condição controle (sem estresse), no entanto, quando o tratamento de déficit hídrico foi imposto, a expressão gênica aumentou consideravelmente. Essas análises sugerem que os genes *rd29A* e *DREB1A* podem apresentar mesmo em condições normal (sem estresse) um nível basal de expressão gênica, resultado induzido pelo "vazamento" pelo promotor. Resultados similares foram encontrados em plantas de tabaco que apresentaram uma expressão basal do gene *DREB1A*, em condição controle, mas em condições de restrição hídrica e frio, houve aumento no nível de expressão (KASUGA et al., 1999). Estes trabalhos mostram que, embora o promotor *rd29A* seja considerado estresse-induzido, devendo ser ativado apenas em condições ambientais adversas, uma expressão basal de *AtDREB1A* pode ocorrer como detectado para as linhagens de soja GMs estudadas neste trabalho.

Kasuga et al. (1999; 2004) também avaliaram o crescimento das plantas GMs de *A. thaliana* e tabaco transformadas com construções contendo o promotor constitutivo *35S:DREB1A* e o promotor estresse induzido *rd29A*. Os autores identificaram que houve diminuição do crescimento das plantas GMs transformadas com o promotor *35S*, quando comparadas às plantas controle e uma expressão contínua do FT *DREB1A* foi detectada em todos os tratamentos. Diferentemente, as plantas transformadas com o promotor estresse induzido *rd29A* apresentaram crescimento normal e expressão gênica crescente no decorrer dos tratamentos aplicados, demonstrando a indução deste promotor na ativação de genes específicos responsivos ao estresse. De modo geral, segundo os autores, mesmo quando uma expressão gênica basal ("vazamento") ocorre em condições normais (não estressadas) o promotor é ainda considerado de expressão estresse induzida, pois se comparado a um promotor constitutivo (35S) que ativa a expressão de genes durante todo o ciclo de vida vegetal, em todos os tecidos e independentemente de indução por estresse biótico ou abiótico, espera-se que o promotor estresse induzido aumente sua atividade em condições de estresse, resultando em maiores níveis de expressão dos genes responsivos.

No trabalho anterior, foi verificado em experimentos realizados em casa de vegetação e a campo mostraram que a linhagem P58 apresentou tamanho reduzido quando comparada a cultivar BR 16, resultado do encurtamento dos internós. Nenhum outro parâmetro de

crescimento foi estatisticamente significativo Estudos de crescimento das plantas GMs P58 e P1142 conduzidos em casa de vegetação e campo revelaram que as diferenças em relação a cultivar BR 16 foram observadas apenas para a linhagem P58 as quais tiveram menor altura causada por encurtamento dos internos. As demais diferenças observadas não foram significativas.

6.4.2 Identificação do número de cópias inseridas do transgene AtDREB1A nas linhagens de soja

Os resultados da análise de *Southern blot* indicaram que as linhagens de soja GMs P58 e P1142 apresentavam um menor número de c (02) inseridas do transgene, enquanto as demais linhagens P59, P1378 e P3069 apresentaram elevado número de inserções (Fig. 02).

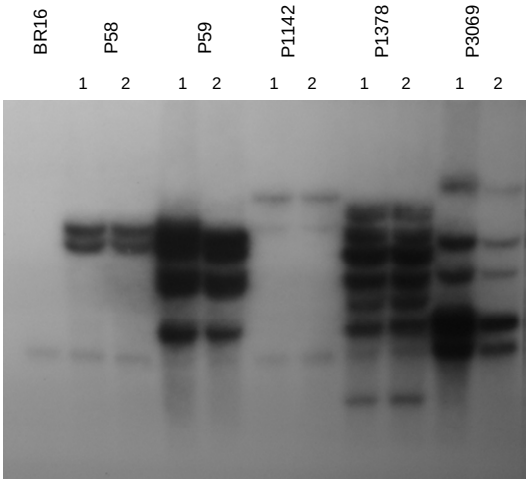


Fig. 2: Southern blot realizado para determinar o número de inserções do cassete inserido nas linhagens de soja GMs contendo o gene AtDREB1A.

O alto número de cópias do transgene detectada nas linhagens P59, P1378 e P3069 pode ser consequência da metodologia de transformação genética utilizada (ROMANO et al., 2005). Dados da literatura mostram que o protocolo de bombardeamento de partículas ou biobalística pode produzir plantas com integração de múltiplas (KOHLI et al., 1998) e usualmente, estas plantas GMs podem apresentar silenciamento gênico (FLAVELL, 1994; VAUCHERET et al., 1998). Os dados de *Northern blot* corroboram esta hipótese uma vez que, para as linhagens GMs P59, P1378 e P3069 a expressão do gene *DREB1A* não foi identificada sugerindo que o FT DREB1A pode ter sido silenciado em decorrência do alto

número de insertos. No entanto, a confirmação deste possível silenciamento só poderá ser realizada via RT-qPCR.

Outro fator que deve ser considerado em um possível silenciamento gênico é o local de inserção destas várias cópias do transgene no genoma hospedeiro (VAUCHERET et al., 1998). Dependendo do sítio de entrada do cassete, as plantas podem ter seu desenvolvimento/crescimento prejudicado o que pode tornar difícil o uso destas linhagens em programas de melhoramento que buscam variedades comerciais estáveis. Para as linhagens GMs P59, P1378 e P3069, no entanto, este fenótipo não foi observado.

6.4.3 Identificação e categorização dos genes diferencialmente expressos nas linhagens GMs P58 e P1142 em condições ambientais normais

A partir dos dados de expressão gênica obtidos no *Northern blot*, da caracterização do número de cópias via *Southern blot*, e considerando-se a expressão basal do promotor na condição controle, as linhagens de soja P58 e P1142 foram selecionadas para estudos de microarranjos de DNA. Um total de 1.475 transcritos foram identificados como diferencialmente expressos nos *arrays* quando comparadas a linhagem GM P58 e a cultivar controle BR 16, sendo 38,78% do total classificado como transcritos induzidos e 61,08% como reprimidos. Para a linhagem GM P1142 foram identificados como diferencialmente expressos aproximadamente 311 transcritos, sendo 49,52% deste total considerados transcritos induzidos e 50,80% reprimidos.

Um maior número de genes diferencialmente expressos na linhagem P58 quando comparada com a linhagem P1142 podem ter sido causado pela maior expressão do gene DREB1A na linhagem P58. É possível ainda que diferenças na expressão gênica entre essas linhagens na condição controle possam ter causado diferenças no comportamento fisiológico sob condições de seca reportados no trabalho descrito anteriormente. Tais autores mostraram que a linhagem P58 apresentou menor transpiração que sua isolinea, o cultivar BR 16 sensível à seca, quando em condições de boa disponibilidade hídrica e principalmente quando o déficit de pressão de vapor estava em torno de 2.4kPa. Para a linhagem P1142 tal característica não foi observada. Os autores sugerem que a melhoria na tolerância à seca da linhagem P58 (retardo no murchamento, maior taxa de sobrevivência, maior área foliar e número de folhas sob estresse hídrico) parece envolver uso conservativo da água quando as plantas estavam em condições de boa disponibilidade hídrica por meio de redução na taxa de transpiração nesta condição. Outros trabalhos apontaram ainda que a linhagem P58 exibiu um fenótipo de murchamento lento e foi

capaz de manter uma maior taxa de fotossíntese e eficiência fotossintética sob estresse hídrico (BENEVENTI, 2006; POLIZEL et al., 2011).

Uma vez identificados os genes diferenciais, uma busca pelas sequências dos transcritos foi realizada no banco de dados do genoma da soja (Phytozome 9.0). Foram obtidas 1.318 e 277, respectivamente para as linhagens P58 e P1142. As linhagens apresentaram genes que tiveram, pelo menos, 1 GO (Gene Onthology) atribuído pelo SoyBase e/ou Blast2Go para P58 e P1142, respectivamente. Estes genes foram agrupados em categorias funcionais utilizando o software Blast2GO e para cada linhagem foram anotados de acordo com os três vocabulários principais do Gene Ontology (GO): processo biológico, função molecular e componente celular. Foram obtidos 25 termos GO para a linhagem P1142 e 29 termos para P58. Estes termos GOs referentes às duas linhagens foram agrupados em grandes classes, de maneira que cada classe foi composta por GOs relacionados a processos semelhantes: regulação de processos biológicos (GO:0050789; GO:0065008), sinalização (GO:0007267), resposta a estresse (GO:0006950), resposta a estímulos (GO:0009628), resposta a estímulos bióticos (GO:0009607), organização de componentes celulares (GO:0006807,GO:0044237), ciclo celular (GO:0007049, GO:0009987), morte celular (GO:0008219), processos catabólicos (GO:0009056), metabolismo de compostos nitrogenados (GO:0006807), metabolismo secundário (GO:0019748), processos biossintéticos (GO:0009058) e, outros processos biológicos (GO:0043170; GO:0051234; GO:0016049; GO:0007154; GO:0007275; GO:0009719; GO:0048856; GO:0009605; GO:0048869; GO:0065008; GO:0016043;GO:0019725; GO:00511716). As linhagens diferem quanto ao número de genes diferencialmente expressos, por isso, para ambas, foi necessário realizar uma normalização de cada classe com o número total de genes correspondente a cada linhagem, sendo possível determinar a porcentagem de sequências (Fig. 3).

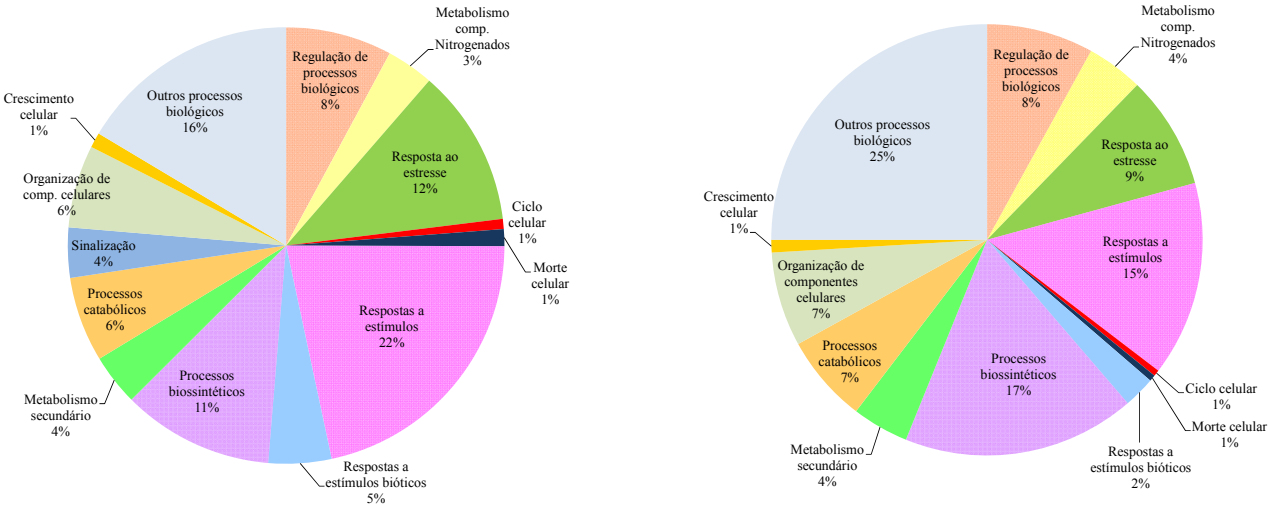


Fig. 3: Categorização funcional das sequências diferencialmente expressas nas linhagens GMs P58 (em A) e P1142 (em B) quanto aos processos biológicos (nível 3), segundo o banco de dados *Gene Onthology* (GO).

6.4.4 Vias metabólicas possivelmente moduladas pelo rd29

Para melhor compreender as vias metabólicas ativadas e reguladas pela expressão do promotor *rd29A* e melhor visualizar os genes diferencialmente expressos nos contexto biológico utilizou-se a ferramenta *Mapman*. Dos 1.475 transcritos diferencialmente expressos identificados na linhagem GM P58, 134 transcritos foram classificados como pertencentes a rotas metabólicas de resposta celular (Fig. 4), 28 transcritos relacionados a resposta a estresses bióticos, e outros 28 envolvidos com estresses abióticos, destes 14 transcritos estão envolvidos a resposta ao calor, 3 transcritos diferencialmente expressos relacionados a mecanismo de resposta ao frio e 1 transcrito identificado como possivelmente responsivo à seca e ao estresse salino (Fig. 4A). Diversas outras vias metabólicas podem ter sido ativadas na linhagem GM P58, tais como relacionadas a parede celular (51 transcritos), sinalização de hormônios (35 transcritos), metabolismo secundário (38 transcritos), proteínas de choque térmico (14 transcritos) dentre outras rotas (Fig. 4B).

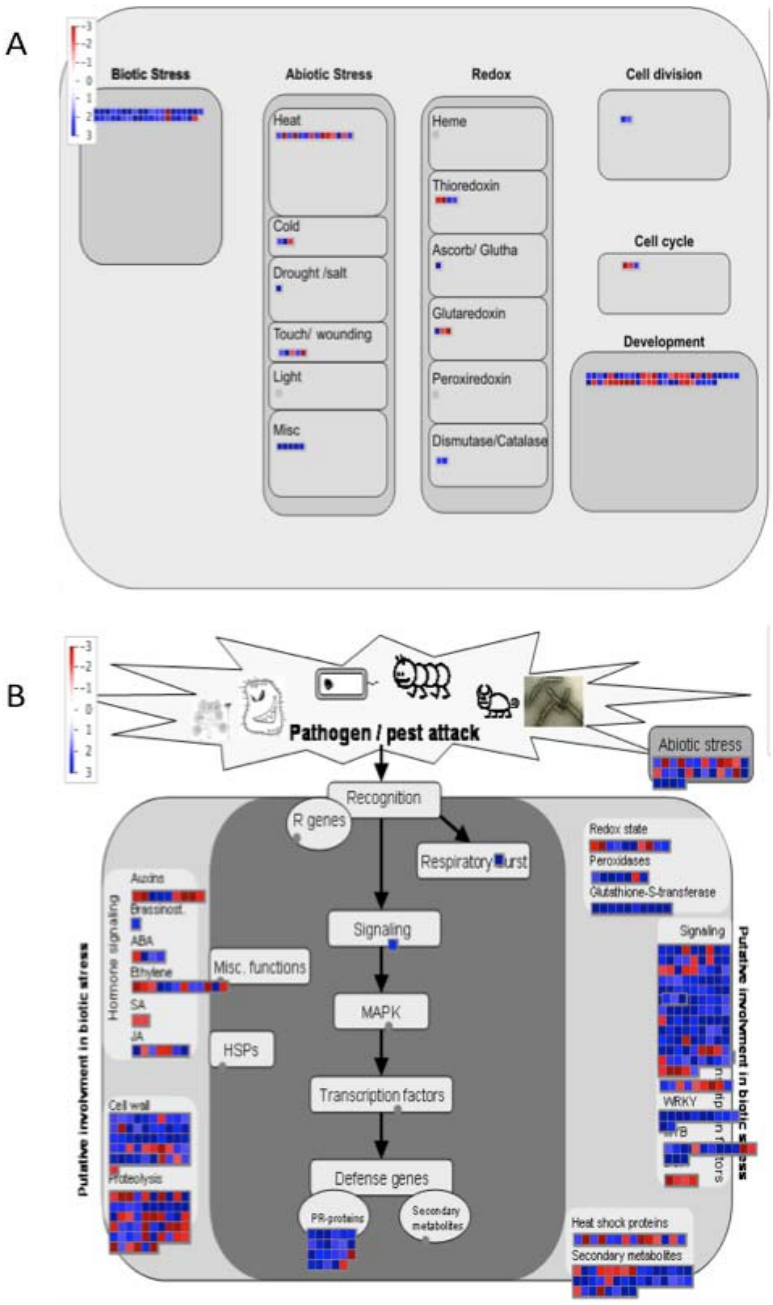


Fig. 4: Visualização das vias metabólicas identificadas na linhagem GM P58 através da ferramenta *Mapman*. Em A, 134 transcritos diferencialmente expressos relacionados a rota de resposta celular, e em B, 451 transcritos diferencialmente expressos relacionados a estresses bióticos e abióticos. O nível de expressão de cada sonda está associado a uma cor específica, vermelho é referente a transcritos que foram *down*-regulados e azul é referente a transcritos que foram *up*-regulados.

Na linhagem GM P1142, dos 311 genes identificados como diferencialmente expressos, 33 genes foram identificados como membros de rotas metabólicas de resposta celular (Fig. 5A), dos quais 9 genes estão relacionados a estresses bióticos, e 2 genes relacionados a estresses

abióticos como calor e seca (Fig. 5A). Ainda, 104 transcritos foram relacionados as mais diversas rotas de estresses bióticos e abióticos, sendo que 17 transcritos que apresentaram expressão diferencial foram relacionado são mecanismo de sinalização de hormônios, 18 relacionados a via metabólica de parede celular, e 12 transcritos foram relacionados a vias de metabolismo secundário (Fig. 5B).

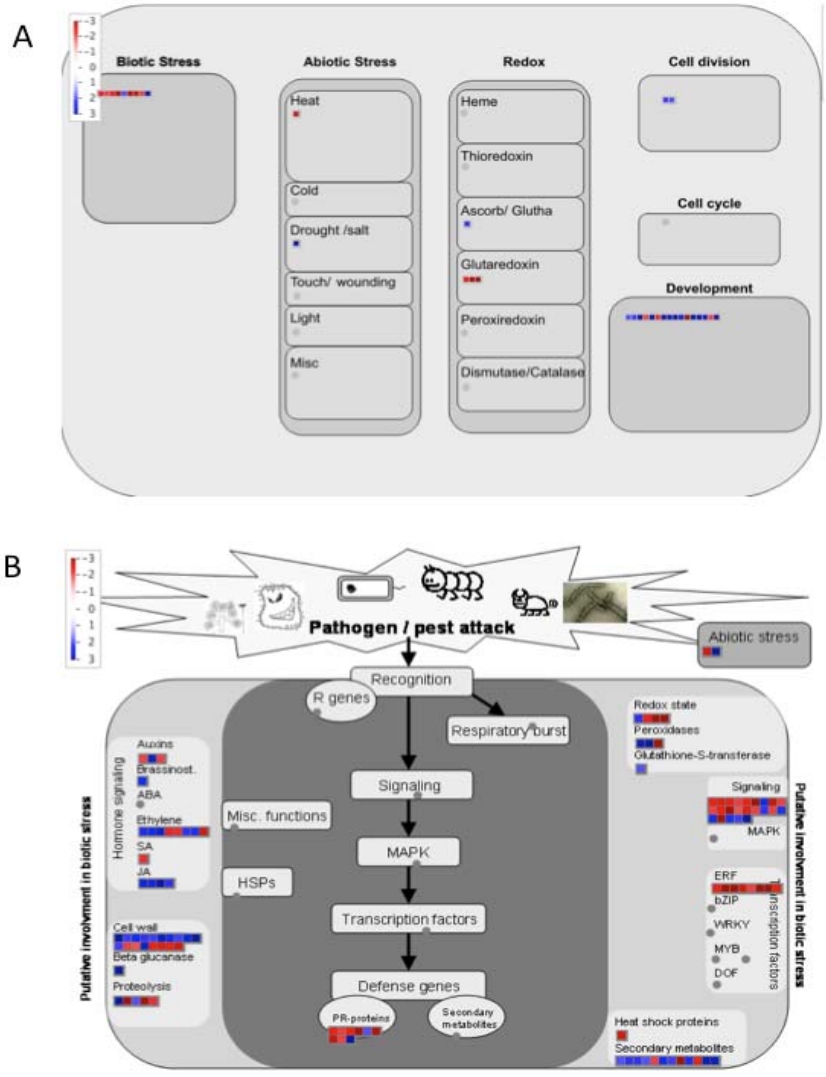


Fig. 5: Visualização das vias metabólicas identificadas na linhagem GM P1142 através da ferramenta *Mapman*. Em A, 33 transcritos diferencialmente expressos foram identificados com envolvidos na resposta celular, e em B, 104 transcritos diferencialmente expressos foram relacionados a estresse bióticos e abióticos. O nível de expressão de cada sonda está associado a uma cor específica, vermelho é referente a transcritos que foram *down*-regulados e azul é referente a transcritos que foram *up*-regulados. Foi utilizado o genoma da soja como referência no *Mapman*.

Diversos fatores de transcrição também foram identificados como diferencialmente expressos. Na linhagem GM P58, 133 transcritos foram relacionados a fatores de transcrição; 12 transcritos apresentaram similaridade com fatores de transcrição WRKY todos induzidos, 13

mostraram similaridade com fatores de transcrição MYB dos quais cinco foram induzidos e três foram reprimidos, nove transcritos exibiram similaridade com fatores de transcrição bZIP, sendo 4 induzidos e 5 reprimidos, e outros nove transcritos com fatores de transcrição C2C2-Co-like foram todos reprimidos, dentre outros. Também para a linhagem P1142, 18 transcritos diferencialmente expressos foram relacionados a fatores de transcrição, dos quais 8 apresentam similaridade com fatores de transcrição AP2/EREBP, sendo todos reprimidos, e dois transcritos foram relacionados aos fatores de transcrição C2H2 apresentaram ser todos reprimidos. Todos estes fatores de transcrição têm sido descrito na literatura científica como relacionados a mecanismos de tolerância vegetal a estresses abióticos e resistência a diversos estresses bióticos em soja (SINGH et al., 2002).

Os FTs MYB estão envolvidos em muitos processos fisiológicos em condições normais ou em condições desfavoráveis, como crescimento (CHEN et al., 2006; YANHUI et al., 2006), formação e desenvolvimento de meristema floral e semente (KIRIK et al., 1998), controle do ciclo celular (ARAKI et al., 2004), defesa e respostas a estresse (ABE et al., 2003), e sinalização de hormônios (NEWMAN et al., 2004). Trabalhos mostram que a super expressão de MYB15 resultou em tolerância aumentada à seca e a salinidade em *A. thaliana* (DING et al., 2009). Em tomate, o gene *Os*MYB4 induziu uma maior tolerância ao estresse hídrico (VANNINI et al., 2007), enquanto que um aumento da tolerância à seca e ao frio foi observado em maçã (PASQUALI et al., 2008). Ainda, *At*MYB41 de *A. thaliana* é transcricionalmente regulada em reposta à seca, salinidade, frio e ABA (LIPPOLD et al., 2009).

Já os WRKYs são outra classe importante de FTs que desempenham várias funções em plantas, incluindo a resposta ao estresse abiótico. Os genes *Gm*WRKY13, *Gm*WRKY21 e *Gm*WRKY54 foram consideradas diferencialmente expressos sob estresse abiótico em *A. thaliana*. Plantas transgênicas de *A. thaliana* super expressando *Gm*WRKY21 mostraram tolerância ao estresse de frio, enquanto que *Gm*WRKY54 conferiu tolerância a salinidade e à seca (ZHOU et al., 2008).

Em plantas, os FT bZIPs (*basic zipper leucine*) estão envolvidos em muitos processos de regulação e de desenvolvimento incluindo sinalização ao ABA, estresses abióticos, maturação de sementes e desenvolvimento floral (JAKOBY et al., 2002). O gene *Zm*bZIP17 foi regulado pela seca, calor, ABA e estresse salino em plântulas de milho (JIA et al., 2009). A super expressão *Os*bZIP23, um membro da subfamília AREB/ABF melhorou significativamente a tolerância à seca e salinidade em arroz transgênico durante a fase reprodutiva (XIANG et al., 2008).

Os fatores de transcrição AP2/ERF foram classificados por Sakuma et al. (2002) em quatro subfamílias: AP2 (APETALA2), RAV (relacionada com a ABI3/VP1), DREB (Desidratação-responsivo proteína elemento de ligação) e ERF (Etileno-responsive factor). Durante estresses abióticos, fatores de transcrição do tipo AP2/EREBP se ligam ao elemento *cis*-atuante DRE de genes estresse-induzidos (CHINNUSAMY et al., 2004) regulando a resposta vegetal a estas condições adversas (NAKANO et al., 2006; LICAUSI et al., 2010; SHARONI et al., 2011). Em especial dentro desta família de FTs, alguns trabalhos mostram que genes da família CBF/DREB têm sido extensivamente utilizados no desenvolvimento de plantas mais tolerantes a estresses abióticos. Li e co-autores (2005), trabalhando com soja, através de análises de ESTs (Expressed Sequence Tags) identificaram a presença de 290 membros da família AP2/EREBP (TIAN et al., 2004), sendo que três genes homólogos de DREB já foram isolados: *Gm*DREBa, *Gm*DREBb, e *Gm*DREBc. Nesta cultura, uma maior tolerância à seca ocorreu em plantas expressando o FT *DREB1A* sob o controle do promotor *rd29A* (POLIZEL et al., 2011). Em amendoim, transformado com a construção gênica *rd29A*:DREB1A observou-se uma maior eficiência de transpiração e acúmulo elevado de algumas das principais enzimas antioxidantes e prolina sob estresse hídrico (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2007; 2009). Oh et al. (2005), observaram uma maior tolerância à seca e a alta salinidade em plantas de arroz super expressando *DREB1A*. Também em arroz, Ito et al.(2006), verificaram que a super expressão de *DREB1A* promoveu tolerância a seca, salinidade e ao frio provocando o acúmulo de osmoprotetores como prolina e vários de tipos de açúcares. Em milho, Qin e colaboradores (2004, 2007) reportaram que *ZmDREB1A* foi induzido por frio e salinidade. Plantas de *Arabidopsis* transformadas com os genes *ZmDREB1A* e *ZmDREB2A* apresentam tolerância aumentada a estresse de frio e alta salinidade (*ZmDREB1A*) e seca e calor (*ZmDREB2A*). Esta característica de tolerância combinada é muito interessante, pois os efeitos de estresses de seca e calor combinados com outros fatores abióticos e bióticos afetam mais severamente o desenvolvimento da planta, do que um único estresse levando a grandes perdas (ATKINSON e URWIN, 2012).

Já as proteínas dedo de zinco (ZFP – *Zinc Fingers Proteins*) do tipo C2H2 (C*ysteine2* e *Histidine2*) formam umas das maiores famílias de FTs em eucariotos (AGARWAL et al., 2007). Desempenham um papel fundamental na regulação das respostas de defesa das plantas a estresse biótico e abiótico (SINGH et al., 2010). O gene *ZPT2-3*, pertencente às proteínas ZFP C2H2 quando expresso constitutivamente em petúnia, resultou em plantas transgênicas mais tolerantes a desidratação (SUGANO et al., 2003). Ainda, *OSISAP1*, um tipo C2H2, de arroz conferiu tolerância ao frio, desidratação e a salinidade em sementes de tabaco

(MUKHOPADHYAY et al., 2004). Todos estes trabalhos ilustram a relevância dos fatores de transcrição na ativação de genes estresse responsivos e regulam as respostas de tolerância vegetal a estresses ambientais. A presença destes fatores nestas plantas GMs plantas utilizadas em nossos estudos sugerem que estes mecanismos podem ter sido ativados na situação controle, mas que em deficit hídrico estas respostas seriam mais pronunciadas conferindo a tolerância à seca.

6.4.5 Análise da região *Upstream* dos genes diferencialmente expressos possivelmente regulados por rd29A:AtDREB1A

Para a linhagem GM P58, das 1.318 sequências analisadas, em 208 genes a presença da região conservada DRE foi identificada *upstream* ao sítio de início de transcrição. Pela análise de microarranjo, destes 208 genes, 130 genes foram classificados como *up*-regulados e 78 genes como *down*-regulados (Tab. 1).

Tabela 1: Genes diferencialmente expressos identificados na linhagem GM P58 contendo o *cis*-elemento DRE na região promotora.

Gene	Descrição	e-value	Orientation	Regulation	Fold change	Average	S.D.
Glyma01g38130.1	ATP-dependent protease	3,7E-02	-	down	2,7	-1,4	0,4
Glyma01g32370.1	There are no functional annotations for this locus	4,7E-02	+	down	3,8	-1,9	0,6
Glyma02g17150.1	KIP1-like protein	8,4E-03	-	down	3,1	-1,6	0,2
Glyma02g04840.1	Arabidopsis protein of unknown function	4,7E-03	-	down	3,4	-1,7	0,1
Glyma02g10820.1	There are no functional annotations for this locus	1,1E-02	-	down	3,3	-1,7	0,2
Glyma02g44410.1	There are no functional annotations for this locus	1,4E-02	-	down	3,9	-2,0	0,3
Glyma02g47330.1	Raffinose synthase or seed inhibitor protein Sip1	6,6E-03	+	down	2,3	-1,2	0,1
Glyma03g33020.1	EamA-like transporter family	2,3E-03	+	down	3,6	-1,8	0,0
Glyma03g29510.1	There are no functional annotations for this locus	7,3E-03	+	down	2,0	-1,0	0,1
Glyma06g45620.1	B-box zinc finger	5,7E-03	+	down	2,2	-1,1	0,1
Glyma04g41880.1	Glycolipid transfer protein related (GLTP)	6,4E-03	+	down	2,8	-1,5	0,1
Glyma06g12340.1	Fe(II)/ Ascorbate oxidase superfamily/aminocyclopropanecarboxylate oxidase	1,6E-02	-	down	2,1	-1,1	0,2
Glyma05g36350.1	GHMP kinases N terminal domain/ Galactokinase	1,0E-02	+	down	2,6	-1,4	0,2
Glyma06g13770.1	Rhodanese-like domain	6,1E-03	+	down	2,2	-1,1	0,1
Glyma04g07900.1	There are no functional annotations for this locus	1,2E-02	-	down	5,5	-2,4	0,3
Glyma06g39810.1	B-box zinc finger	3,5E-02	-	down	3,1	-1,6	0,4
Glyma06g20950.1	N-MYC downstream regulated	1,9E-03	+	down	2,6	-1,4	0,0
Glyma04g33770.1	There are no functional annotations for this locus	6,4E-03	+	down	4,6	-2,2	0,2
Glyma06g42180.1	Dynein light chain type 1	4,5E-03	+	down	2,6	-1,4	0,1
Glyma06g11220.1	Viral A-type inclusion protein repeat/M pretein repeat	1,3E-02	-	down	37,4	-5,2	0,7
Glyma11g35490.1	Zinc finger, C3HC4 type (RING finger)	1,7E-02	-	down	2,2	-1,1	0,2
Glyma12g16160.1	Cyclic nucleotide-binding domain/Voltage and ligand gated potassium channel	5,7E-03	+	down	2,4	-1,3	0,1
Glyma11g13110.1	F-box and WD40 domain protein	7,4E-03	+	down	2,3	-1,2	0,1
Glyma12g02640.1	Aquaporim transporter	6,7E-03	-	down	3,4	-1,8	0,2
Glyma08g43790.1	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type	3,0E-03	+	down	5,3	-2,4	0,1
Glyma09g02350.1	GDP-fucose protein O-fucosyltransferase	2,3E-02	-	down	3,3	-1,7	0,3
Glyma11g33580.1	Condensin complex subunit 3-related	3,0E-02	+	down	2,7	-1,4	0,3
Glyma12g03420.1	Dirigent-like protein/Nucleoporin-related	3,9E-02	+	down	2,1	-1,1	0,3
Glyma12g00730.1	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor	5,5E-03	+	down	4,0	-2,0	0,1
Glyma12g08060.1	Protein of unknown function	4,6E-03	+	down	3,0	-1,6	0,1
Glyma09g24780.1	There are no functional annotations for this locus	4,5E-02	+	down	2,2	-1,1	0,3
Glyma12g04880.1	BURP domain	2,5E-02	+	down	3,2	-1,7	0,4
Glyma12g04420.1	Protein folding regulator/Vacuole fusion inheritance and cystosol-to-vacuole protein	6,0E-03		down	2,0	-1,0	0,1
Glyma09g03840.1	There are no functional annotations for this locus	2,7E-02	+	down	2,6	-1,4	0,3
Glyma09g35030.1	There are no functional annotations for this locus	3,2E-03	-	down	3,8	-1,9	0,1
Glyma08g45560.1	Trypsin and protease inhibitor	4,5E-03	+	down	5,2	-2,4	0,1
Glyma13g34420.1	There are no functional annotations for this locus	1,1E-02	+	down	2,1	-1,0	0,1
Glyma15g32330.1	CCT motif	3,9E-02	+	down	3,4	-1,8	0,5
Glyma13g39620.1	Zinc finger, C2H2 type	2,2E-02	+	down	3,0	-1,6	0,3
Glyma18g40100.1	There are no functional annotations for this locus	1,8E-02	-	down	5,1	-2,4	0,4
Glyma13g37750.1	Wound-induced protein	1,8E-02	-	down	2,9	-1,5	0,3

Tabela 1: Continua.

Gene	Descrição	e-value	Orientation	Regulation	Fold change	Average	S.D.
Glyma17g02670.1	Glutaredoxin and related proteins	3,3E-03	+	down	3,3	-1,7	0,1
Glyma15g08900.1	There are no functional annotations for this locus	1,0E-02	+	down	2,9	-1,5	0,2
Glyma18g40560.1	Short chain dehydrogenase	1,7E-02	+	down	2,5	-1,3	0,2
Glyma18g53680.1	Phosphatidylethanolamine-binding protein	2,9E-02	+	down	5,9	-2,6	0,6
Glyma15g04650.1	Protein of unknown fuction	3,0E-02	-	down	2,1	-1,0	0,2
Glyma17g12570.1	Zn-finger in Ran binding protein and others	2,6E-02	-	down	2,1	-1,1	0,2
Glyma13g23440.1	HRDC domain	1,3E-02	-	down	2,2	-1,1	0,2
Glyma13g32160.1	B-box zinc finger	7,3E-03	-	down	3,6	-1,8	0,2
Glyma17g36270.1	Patatin-like phospholipase/Ca2+-independent phospholipase A2	1,3E-02	-	down	4,4	-2,2	0,3
Glyma14g32900.1	alpha/beta hydrolase fold	4,0E-03	+	down	3,5	-1,8	0,1
Glyma14g00800.1	Dimerisation domain/O-Methyltransferase	3,3E-02	-	down	2,0	-1,0	0,3
Glyma18g04080.1	ATPase family associated with various cellular activities (AAA)	6,1E-03	-	down	2,5	-1,3	0,1
Glyma12g30270.1	Zinc finger, C2H2 type	6,1E-03	+	down	2,5	-1,3	0,1
Glyma15g12480.1	There are no functional annotations for this locus	6,2E-03	+	down	3,2	-1,7	0,1
Glyma17g36860.1	2-Hydroxyacid dehydrogenase	8,2E-03	+	down	2,2	-1,1	0,1
Glyma20g35280.1	auxin-responsive protein IAA	5,3E-03	+	down	2,5	-1,3	0,1
Glyma13g00630.1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase/Cation transport ATPase	2,9E-03	+	down	2,8	-1,5	0,0
Glyma16g27840.1	There are no functional annotations for this locus	1,4E-02	+	down	2,3	-1,2	0,2
Glyma17g01930.1	There are no functional annotations for this locus	2,9E-03	-	down	5,7	-2,5	0,1
Glyma20g37790.1	There are no functional annotations for this locus	1,1E-02	+	down	2,1	-1,1	0,1
Glyma13g39450.1	Acyl CoA reductase	3,5E-03	-	down	2,0	-1,0	0,0
Glyma20g30230.1	Fatty acid hydroxylase superfamily/With NADH or NADPH	6,3E-03	+	down	2,8	-1,5	0,1
Glyma09g25800.1	Remorin, C-terminal region	7,8E-03	-	down	2,4	-1,2	0,1
Glyma20g28500.1	Protein of unknown function	1,9E-02	-	down	2,0	-1,0	0,2
Glyma09g30650.1	Methyltransferase domain	3,9E-02	-	down	7,5	-2,9	0,8
Glyma10g37560.1	Fatty acid hydroxylase superfamily	7,4E-03	+	down	3,1	-1,6	0,2
Glyma07g38780.1	There are no functional annotations for this locus	2,8E-02	-	down	2,7	-1,4	0,3
Glyma14g23860.1	Pheophorbide a oxygenase/IRON-SULFUR DOMAIN CONTAINING PROTEIN	3,3E-03	+	down	2,4	-1,3	0,1
Glyma13g21310.1	Sulfite exporter TauE/SafE/ATP-dependent protease	1,7E-02	-	down	2,9	-1,6	0,3
Glyma15g10660.1	histidine-containing phosphotransfer peotein/Hpt domain	3,1E-02	+	down	2,0	-1,0	0,2
Glyma09g36010.1	alpha/beta hydrolase fold	1,1E-02	+	down	2,3	-1,2	0,1
Glyma10g30130.1	Pyridoxal-phosphate dependent enzyme/Cysteine synthase	3,0E-02	+	down	2,0	-1,0	0,2
Glyma14g39620.1	There are no functional annotations for this locus	3,4E-03	+	down	2,2	-1,2	0,1
Glyma17g10920.1	Dof domain, zinc finger	7,2E-03	+	down	3,2	-1,7	0,2
Glyma10g38890.1	Aldo/keto reductase family/Voltage-gated shaker-like K+ channel	1,7E-02	-	down	2,1	-1,1	0,2
Glyma15g23830.1	Extensin-like protein repeat/proline rich protein	7,0E-03	-	down	2,7	-1,5	0,1
Glyma14g22840.1	Morn repeat/PHOSPHATIDYLINOSITOL-4-PHOSPHATE 5-KINASE RELATED	2,2E-03	+	down	2,3	1,1	0,2
Glyma13g44460.1	There are no functional annotations for this locus	3,0E-02		up	2,0	1,0	0,2
Glyma01g28440.1	Plant protein of unknown function	3,0E-02	+	up	2,1	1,1	0,2
Glyma01g15860.1	there are no functional annotations for this locus	3,2E-02	+	up	2,3	1,2	0,3
Glyma01g36480.1	Chitinase class I	3,5E-03	+	up	2,0	1,0	0,0

Tabela 1: Continua.

Gene	Descrição	e-value	Orientation	Regulation	Fold change	Average	S.D.
Glyma01g41070.1	C2 domain	1,8E-02	-	up	4,4	2,1	0,4
Glyma02g13470.1	Serine/threonine protein kinase	7,6E-03	-	up	2,4	1,2	0,1
Glyma02g06610.1	Protein of unknown fuction	3,2E-03	+	up	3,5	1,8	0,1
Glyma01g41920.1	L-lactate dehydrogenase.	4,9E-03	+	up	2,2	1,1	0,1
Glyma02g10210.1	CALCIUM BINDING PROTEINS	7,7E-03	+	up	6,5	2,7	0,3
Glyma02g11600.1	INOSINE-5-MONOPHOSPHATE DEHYDROGENASE RELATED	2,2E-03	+	up	2,2	1,1	0,0
Glyma02g01250.1	there are no functional annotations for this locus	8,6E-03	+	up	2,6	1,4	0,1
Glyma02g16710.1	Aspartyl protease	3,2E-02	+	up	2,1	1,1	0,3
Glyma01g41200.1	Serine/threonine protein kinase plant type	6,5E-03	+	up	2,3	1,2	0,1
Glyma01g42560.1	Uncharacterized membrane protein, predicted efflux pump	4,2E-02	+	up	3,0	1,6	0,4
Glyma01g44910.1	Hsp70 protein/Heat shock protein	1,3E-02	-	up	2,1	1,1	0,2
Glyma02g01740.1	Myb-like DNA-binding domain	1,8E-02	+	up	4,7	2,2	0,4
Glyma03g06650.1	Zinc knuckle/Ammonium Transporter	9,4E-03	+	up	2,5	1,3	0,1
Glyma03g04920.1	Protease inhibitor/seed storage/LTP family	1,0E-02	+	up	6,0	2,6	0,3
Glyma02g47880.1	Fasciclin domain	2,5E-02	-	up	2,3	1,2	0,2
Glyma03g34490.1	GLUCOSYL/GLUCURONOSYL TRANSFERASES	3,8E-02	-	up	2,2	1,1	0,3
Glyma02g41930.1	Mitochondrial carrier protein related	6,3E-03	+	up	2,1	1,1	0,1
Glyma03g09080.1	Plant protein of unknown function	1,5E-02	+	up	2,1	1,1	0,2
Glyma03g12230.1	Serine/threonine protein kinase /Lectin domain	3,7E-02	+	up	4,7	2,2	0,6
Glyma06g05830.1	There are no functional annotations for this locus	2,0E-02	-	up	4,2	2,1	0,4
Glyma05g15700.1	Protein of unknown fuction (DUF579)	2,9E-03	-	up	3,3	1,7	0,1
Glyma06g06870.1	Cellulose synthase	9,3E-03	+	up	2,0	1,0	0,1
Glyma04g34890.1	There are no functional annotations for this locus	2,0E-02	+	up	2,3	1,2	0,2
Glyma05g21220.1	Myb-like DNA-binding domain	2,4E-02	+	up	2,4	1,3	0,3
Glyma05g34760.1	Calmodulin binding protein-like	1,4E-02	-	up	3,8	1,9	0,3
Glyma03g39950.1	Heavy-metal-associated domain/COPPER TRANSPORT PROTEIN ATOX1-RELATED	7,4E-03	+	up	3,6	1,8	0,2
Glyma06g10580.1	there are no functional annotations for this locus	8,8E-03	+	up	4,8	2,3	0,2
Glyma05g32850.1	No apical meristem (NAM) protein	4,5E-03	+	up	3,5	1,8	0,1
Glyma04g06780.1	Cellulose synthase	5,2E-03	+	up	2,3	1,2	0,1
Glyma04g32130.1	COBRA-like protein	3,4E-02	-	up	2,9	1,5	0,4
Glyma05g08650.1	NAD dependent epimerase/dehydratase/Flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase	6,1E-03	+	up	2,2	1,1	0,1
Glyma06g35110.1	UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase	2,1E-02	+	up	2,5	1,3	0,2
Glyma06g03860.1	Cytochrome P450	2,2E-02	-	up	2,3	1,2	0,2
Glyma04g03250.1	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies	3,2E-02	-	up	2,8	1,5	0,4
Glyma04g05350.1	alpha/beta hydrolase fold/MYC downstream regulated(NDR1 protein)	5,5E-03	-	up	2,1	1,1	0,1
Glyma08g40880.1	IQ calmodulin-binding motif	7,3E-03	-	up	2,1	1,1	0,1
Glyma09g05700.1	VQ motif	1,6E-02	-	up	2,3	1,2	0,2
Glyma09g39190.1	Protein tyrosine kinase/Extracellular signal-regulated kinase	8,2E-03	-	up	2,0	1,0	0,1
Glyma09g09110.1	Ribosomal L18p/L5e family	9,3E-03	-	up	2,2	1,2	0,1
Glyma11g12720.1	Sugar (and other) transporter	8,0E-03	+	up	2,2	1,1	0,1
Glyma12g09240.1	Cytochrome P450/ CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies	5,7E-03	+	up	4,3	2,1	0,2

Tabela 1: Continua

Gene	Descrição	e-value	Orientation	Regulation	Fold change	Average	S.D.
Glyma08g04390.1	Leucine rich repeat N-terminal domain	3,3E-03	+	up	2,8	1,5	0,1
Glyma12g07400.1	Serine-Threonine protein kinase plant type	1,5E-03	+	up	2,0	1,0	0,0
Glyma11g36940.1	There are no functional annotations for this locus	1,7E-02	-	up	2,5	1,3	0,2
Glyma08g39390.1	Thioredoxin, nucleoredoxin and related proteins	5,8E-03	-	up	2,2	1,2	0,1
Glyma07g39250.1	WRKY DNA -binding domain	7,3E-03	+	up	2,1	1,1	0,1
Glyma11g11430.1	Senescence-associated protein	5,1E-03	-	up	2,3	1,2	0,1
Glyma08g20230.1	Lipoxygenase	5,1E-03	-	up	2,3	1,2	0,1
Glyma08g14900.1	Cytocrome P450/CYP2 superfamily	1,7E-02		up	3,1	1,6	0,3
Glyma08g14050.1	Protein of unknown function (DUF707)	3,6E-02	-	up	2,0	1,0	0,3
Glyma09g18560.1	Core-2/I-Branching enzyme	5,5E-03	-	up	2,1	1,1	0,1
Glyma11g05360.1	Acyl CoA binding protein	7,3E-03	+	up	2,2	1,1	0,1
Glyma08g00400.1	Helicase conserved C-terminal domain/SNF2 family N-terminal domain	4,0E-02	+	up	5,1	2,3	0,6
Glyma11g20720.1	Fasciclin domain	1,8E-02	-	up	3,6	1,8	0,3
Glyma08g45470.1	Caspase domain/LSD1 zinc finger/Metacaspase involved in regulation apoptosis	2,1E-02	+	up	2,2	1,1	0,2
Glyma12g10370.1	Protein tyrosine kinase/MAPKK	3,7E-03	+	up	3,5	1,8	0,1
Glyma08g14270.1	There are no functional annotations for this locus	1,3E-02	-	up	3,0	1,6	0,2
Glyma09g03550.1	Micochondrial carrier protein related	2,8E-02	+	up	2,3	1,2	0,3
Glyma09g02430.1	Ankyrin repeat/Kelch-related protein	3,1E-03	-	up	2,0	1,0	0,0
Glyma08g01880.1	Protein tyrosine kinase/MAPKK	3,1E-02	-	up	3,2	1,7	0,4
Glyma08g13900.1	Copine/Predicted E3 ubiquitin ligase	1,2E-02	-	up	2,5	1,3	0,2
Glyma10g05650.1	PWWP domain	3,4E-02	-	up	2,1	1,0	0,3
Glyma11g13810.1	Glycosyl hydrolase family 1	7,6E-03	+	up	2,1	1,1	0,1
Glyma11g14070.1	CcmE/Cytocrome	4,1E-03	-	up	2,5	1,3	0,1
Glyma09g05960.1	Ankyrin repeat-containing	7,2E-03	-	up	12,2	3,6	0,3
Glyma11g37350.1	Ankyrin repeat-containing	3,8E-02	+	up	2,5	1,3	0,3
Glyma13g01330.1	Ligand-gated ion channel/Ionotropic glutamate receptor-related	1,1E-02	-	up	2,9	1,5	0,2
Glyma18g48310.1	Ank-repeat-containing	8,6E-03	+	up	2,4	1,2	0,1
Glyma17g36270.1	Acyl CoA binding protein	2,3E-02	-	up	2,5	1,3	0,3
Glyma19g01780.1	Cytochrome P450/ CYP2 subfamily	3,0E-02	+	up	7,5	2,9	0,7
Glyma19g29100.1	Regulator of chromosome condensation (RCC1) repeat	8,4E-03	+	up	2,6	1,4	0,1
Glyma14g35190.1	UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase	2,4E-02	+	up	3,3	1,7	0,3
Glyma18g19450.1	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family	9,9E-03	+	up	2,3	1,2	0,1
Glyma13g29870.1	There are no functional annotations for this locus	3,3E-02	+	up	2,6	1,4	0,3
Glyma15g13500.1	Peroxidase	3,2E-03	+	up	2,8	1,5	0,1
Glyma14g00570.1	VQ motif	2,1E-02	-	up	2,4	1,3	0,2
Glyma13g37830.1	Transferase family	1,2E-02	-	up	3,0	1,6	0,2
Glyma13g04670.1	Cytochrome P450	1,7E-03	+	up	5,8	2,5	0,0
Glyma17g38120.1	Multicopper oxidase	6,2E-03	+	up	3,4	1,8	0,1
Glyma20g03400.1	There are no functional annotations for this locus	6,5E-03	-	up	3,5	1,8	0,2
Glyma18g52740.1	CALCIUM BINDING PROTEINS	4,9E-03	+	up	4,6	2,2	0,1
Glyma19g27260.1	GRAM domain	4,6E-03	-	up	2,2	1,1	0,1

Tabela 1: Continua

Gene	Descrição	e-value	Orientation	Regulation	Fold change	Average	S.D.
Glyma17g33370.1	Serine/Threonine protein kinase	1,9E-02	+	up	2,5	1,3	0,2
Glyma15g02150.1	Ankyrin repeat containing/26S proteasome regutatory complex, subuint PSMD10	4,5E-02	+	up	3,2	1,7	0,5
Glyma15g01710.1	Sulfate transporter family/STAS domain	2,2E-03	+	up	2,6	1,4	0,0
Glyma14g24430.1	Aquaporim transporter	4,4E-02	+	up	4,2	2,1	0,6
Glyma16g27950.1	AP2 domain	2,6E-02	+	up	2,0	1,0	0,2
Glyma17g02000.1	Aspartyl proteases	5,1E-03	+	up	2,3	1,2	0,1
Glyma17g34440.1	There are no functional annotations for this locus	8,6E-03	+	up	2,5	1,3	0,1
Glyma13g09340.1	Serine/threonine protein kinase	1,7E-02	-	up	10,7	3,4	0,6
Glyma12g36690.1	NAD dependent epimerase/dehydratase/Flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase	2,0E-02	+	up	2,2	1,1	0,2
Glyma14g00720.1	Fasciclin domain	4,7E-02	-	up	2,5	1,3	0,4
Glyma18g41590.1	Protease inhibitor/seed storage/LTP family	1,5E-02	+	up	2,2	1,1	0,2
Glyma18g05700.1	Structural constituent of ribosome	5,4E-03	-	up	2,3	1,2	0,1
Glyma17g18310.1	There are no functional annotations for this locus	1,5E-02	+	up	2,5	1,3	0,2
Glyma13g29450.1	Protein of unknown function	3,0E-02	+	up	2,2	1,1	0,3
Glyma12g28630.1	Protein tyrosine kinase/MAPKK	1,3E-02	+	up	6,3	2,7	0,4
Glyma16g33710.1	Trypsin and protease inhibitor	3,9E-03	-	up	2,6	1,4	0,1
Glyma19g00640.1	No apical meristem (NAM) protein	3,5E-02	+	up	4,6	2,2	0,6
Glyma20g35180.1	Myb-like DNA-binding domain/ Transcription factor	3,9E-03	-	up	3,1	1,6	0,1
Glyma12g30970.1	alpha/beta hydrolase fold	2,8E-03	+	up	6,3	2,7	0,1
Glyma15g09240.1	Fasciclin domain	9,0E-03	+	up	3,1	1,6	0,2
Glyma17g00880.1	There are no functional annotations for this locus	1,8E-02	+	up	3,0	1,6	0,3
Glyma19g30460.1	Alpha-L-arabinofuranosidase C-terminus	3,2E-02	-	up	2,7	1,4	0,3
Glyma14g09680.1	Acyl CoA binding protein	1,1E-02	-	up	2,8	1,5	0,2
Glyma14g09560.1	F-box domain/Sulfur metabolite repression control protein	3,9E-02	-	up	2,9	1,5	0,4
Glyma17g01170.1	Protein of unknown function	6,3E-03	+	up	3,2	1,7	0,1
Glyma11g19840.1	Copper/zinc superoxide dismutase (SODC)	2,1E-02	-	up	2,2	1,1	0,2
Glyma17g34590.1	Glycosyl hydrolases family 32 C terminal	1,3E-02	+	up	2,0	1,0	0,1
Glyma15g19840.1	Divergent CCT motif/tify domain	5,7E-03	+	up	2,2	1,1	0,1
Glyma13g17930.1	ABC transporter transmembrane region/ATP-binding	4,2E-03	+	up	5,5	2,5	0,1
Glyma15g00730.1	MYC/Helix-loop-helix DNA-binding domain	3,2E-02	-	up	3,0	1,6	0,4
Glyma10g01200.1	Protein serine/threonine protein kinase	5,8E-03	-	up	2,0	1,0	0,1
Glyma14g09830.1	Interferon-related developmental regulator (IFRD)	5,1E-03	+	up	2,2	1,1	0,1
Glyma09g08290.1	Divergent CCT motif/tify domain	3,8E-02	+	up	2,4	1,3	0,3
Glyma06g10660.1	F-box domain/phosphatidylserine receptor	1,5E-02	-	up	2,0	1,0	0,2
Glyma13g26290.1	VQ motif	8,5E-03	+	up	3,6	1,9	0,2
Glyma19g39950.1	alpha/beta hydrolase fold	1,9E-02	+	up	2,1	1,1	0,2
Glyma06g44870.1	Ankyrin repeat containing/26S proteasome regutatory complex, subuint PSMD10	4,2E-03	+	up	2,2	1,2	0,1
Glyma07g31050.1	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	5,5E-03	-	up	3,0	1,6	0,1
Glyma14g37350.1	Fatty acid desaturase/Domain of unknown function	2,0E-02	-	up	2,0	1,0	0,2
Glyma06g16440.1	No apical meristem (NAM) protein	3,2E-03	+	up	2,7	1,4	0,1
Glyma06g22410.1	COBRA-like protein	2,3E-03	+	up	2,1	1,0	0,0
Glyma04g08800.1	Protein kinase domain (Casein kinase)	1,5E-02	-	up	2,8	1,5	0,2
Gl ma13g30950.1	There are no functional annotations for this locus	2,1E-02	+	up	2,1	1,1	0,2
ma03g36260.1	Fasciclin domain/related adhesion glycoproteins	4,9E-03	+	up	2,0	1,0	0,1
ma13g17260.1	Chaperonin 10 Kd subunit	3,4E-03	-	up	2,8	1,5	0,1

Para a linhagem P1142, após a análise das 277 sequências completas, 35 genes apresentaram o *motif* DRE, sendo 20 genes classificados como *down*-regulados e 15 como *up*-regulados pelos resultados de microarranjo (Tabela 2). Todos os *genemodels* que apresentaram o domínio central DRE em sua região promotora foram considerados como genes candidatos à regulação gênica pelo fator de transcrição *DREB1A*.

Tabela 2: Genes diferencialmente expressos identificados na linhagem GM P1142 contendo o *cis*-elemento DRE na região promotor.

ID Gene	Description	Corrected p-value	Orientation	Regulation	FCAbsolute	Average	S.D.
Glyma02g10210.1	Unknown/CALCIUM BINDING PROTEINS	1,7E-02	+	up	2,3	1,2	0,1
Glyma03g04920.1	Lipid transfer protein precursor/Protease inhibitor/seed storage/LTP family	1,6E-02	+	up	18,1	4,2	0,3
Glyma03g42030.1	Unknown/RAS-RELATED GTPASE	1,9E-02	-	up	2,3	1,2	0,1
Glyma05g15700.1	Protein of unknown fuction	1,3E-02	-	up	3,0	1,6	0,1
Glyma06g06870.1	Cellulose synthase	3,0E-02	+	up	2,5	1,3	0,2
Glyma13g30070.1	GDP-fucose protein O-fucosyltransferase/growth regulator	3,0E-02	-	up	2,8	1,5	0,2
Glyma12g30970.1	ALPHA/BETA HYDROLASE RELATED	1,9E-02	+	up	2,6	1,4	0,1
Glyma14g09680.1	Acyl CoA binding protein	3,0E-02	-	up	2,4	1,2	0,2
Glyma13g39450.1	Acyl CoA binding protein	2,3E-02	+	up	2,2	1,2	0,1
Glyma08g01880.1	Protein tyrosine kinase	1,2E-02	+	up	2,8	1,5	0,1
Glyma16g33710.1	Trypsin and protease inhibitor	1,5E-02	-	up	2,3	1,2	0,1
Glyma17g35480.1	Acyl CoA binding protein/Unknown	3,4E-02	-	up	2,4	1,3	0,2
Glyma19g03770.1	Transferase family	3,2E-02	+	up	2,3	1,2	0,2
Glyma19g29100.1	REGULATOR OF CHROMOSOME CONDENSATION	2,9E-02	+	up	2,0	1,0	0,1
Glyma16g27900.1	Peroxidase	3,5E-02	-	up	6,2	2,6	0,4
Glyma02g04840.1	Arabidopsis protein of unknown function	4,1E-02	-	down	7,2	-2,9	0,5
Glyma01g44660.1	There are no functional annotations for this locus	4,8E-02	+	down	2,8	-1,5	0,3
Glyma05g17470.1	Leucine-rich repeat-containing protein	3,4E-02	+	down	2,9	-1,5	0,2
Glyma05g32040.1	AP2 domain	2,0E-02	+	down	3,6	-1,9	0,2
Glyma04g39510.1	AP2 domain	2,3E-02	-	down	2,1	-1,1	0,1
Glyma06g12670.1	There are no functional annotations for this locus	2,9E-02	-	down	2,3	-1,2	0,1
Glyma08g15350.1	AP2 domain	2,2E-02	+	down	2,7	-1,5	0,1
Glyma08g43790.1	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type/rna bining	4,0E-02	+	down	2,4	-1,3	0,2
Glyma10g24270.1	Iron/ascorbate family oxidoreductases	4,0E-02	+	down	2,2	-1,1	0,2
Glyma14g39300.1	Syringolide induced	1,8E-02	+	down	2,3	-1,2	0,1
Glyma15g26790.1	Leucine Rich Repeat/polygalacturonase	2,2E-02	+	down	2,8	-1,5	0,1
Glyma19g44810.1	Auxin responsive protein	4,1E-02	-	down	2,1	-1,1	0,2
Glyma17g36270.1	Patatin-like phospholipase	1,3E-02		down	4,4	**-2,2**	0,3
Glyma16g04380.1	There are no functional annotations for this locus	2,7E-02	+	down	3,1	-1,6	0,2
Glyma17g02670.1	Glutaredoxin and related proteins	2,1E-02	+	down	5,6	-2,5	0,2
Glyma16g28540.1	Leucine-rich repeat protein	1,9E-02	-	down	3,0	-1,6	0,1
Glyma19g43580.1	Synovial sarcoma assosciated SS18 protein	1,6E-02	+	down	2,4	-1,3	0,1
Glyma12g02550.1	Pollen allergen	1,5E-02	+	down	2,6	-1,4	0,1
Glyma11g04620.1	There are no functional annotations for this locus	1,3E-02	-	down	3,3	-1,7	0,1
Glyma06g44870.1	Ankyrin repeat-containing	1,6E-02	+	down	15,7	-4,0	0,2

O elemento DRE é essencial para a indução da expressão do gene *rd29A* em estresse osmótico, seca, salinidade, congelamento, mas não para a ativação deste gene em resposta a ABA (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 1994).

Observando todas as sequências dos genes preditos que tiveram a presença do *motif* DRE (208 genes identificados na linhagem P58 e 35 na linhagem P1142) (observada no programa PLACE, PlantCare), identificada em sua região promotora foi possível ainda, pelo programa MEME (*Multiple EM for Motif Elicitation*, BAILEY & ELKAN, 1994) identificar nos genes diferencialmente expressos, três sequências altamente conservadas para o *motif* DRE, ACCGAC, A/GCCGAC e TACCGACAT (Fig. 6). O *motif* DRE apresenta 9 pares de bases, no entanto a presença de 6 pares de bases conservadas A/GCCGAC é suficiente para identificar o *motif* na sequência gênica, à qual a proteína DREB1A se liga especificamente ativando a expressão gênica (SAKUMA et al., 2002). O domínio central A/GCCGAC foi observado 1000 *upstream* 5'UTR, nos 16 *glymas* em estudo, sendo posteriormente selecionados para análise mais detalhada.

Name	Strand	Start	*p*-value	Sites
Glyma17g36270.1	-	91	6.46e-05	AAAAAAATAC ACCGAC CAAAGTTCAT
Glyma17g35480.1	-	707	6.46e-05	TTGCGGAGTC ACCGAC GTGTGTTACA
Glyma16g33710.1	-	360	6.46e-05	TCACACCCAC ACCGAC AGTATTATTA
Glyma14g09680.1	-	881	6.46e-05	GGAAGGGGTC ACCGAC GTGTGTGACA
Glyma11g13810.1	+	355	6.46e-05	AAATGTGGAA ACCGAC ACGAGCATGA
Glyma06g44870.1	-	345	6.46e-05	TATCTTACGA ACCGAC GTGTAAAATC
Glyma06g06870.1	+	136	6.46e-05	TTAGTAGATT ACCGAC AGAAATTTTA
Glyma05g15700.1	-	759	6.46e-05	TCTCAACCCA ACCGAC ATTAACTAGA
Glyma03g04920.1	+	268	6.46e-05	CAGTATCATC ACCGAC AAAACATGCA
Glyma02g10210.1	+	993	6.46e-05	TGCTCTAGGA ACCGAC T
Glyma17g02670.1	+	814	9.29e-05	CGAATTCGAA GCCGAC CCAAATATCT
Glyma13g39450.1	-	706	9.29e-05	CTGTTTCAAA GCCGAC ACTAATTTCT
Glyma08g43790.1	+	708	9.29e-05	TACACATGTT GCCGAC CTGCGCATAT
Glyma02g04840.1	-	840	9.29e-05	CACATCACTA GCCGAC ATTGTTCTCT
Glyma12g30970.1	+	354	1.58e-04	TCACGTAAAT ACCGAG AAAATTGTCA
Glyma08g01880.1	-	826	1.58e-04	AATACCCTGT ACCGAG ACACCCAGTG

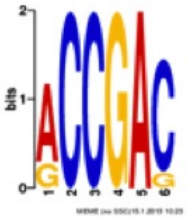


Fig. 6: Logo de Modelo de Higger Markov (HMM) obtidos pelo programa MEME, baseado na sequência consenso dos promotores dos 16 *glymas* preditos. Sequência conservada hipotética para domínio central DRE encontrada na região promotora dos genes identificados como diferencialmente expressos e candidatos à regulação pelo FT *DREB1A*. Letras de tamanho menor indicam variação de bases nitrogenadas na posição.

Quando ambas a as linhagens GMs P58 e P1142 foram comparadas para todos os genes diferencialmente expressos que apresentaram em sua região promotora a sequência DRE, 16 genes foram identificados. A presença desse *cis*-elemento nos promotores desses genes, sugere que os mesmo sejam potenciais candidatos ao controle da ativação/expressão modulada pelo FT *DREB1A*, e dessa forma, pelo transgene *rd29A*:*AtDREB1A* para as linhagens GMs. A análise de elementos *cis*-atuantes e seus fatores de transcrição fornecem informações mais precisas sobre o complexo de sistemas de regulação da expressão gênica (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2005; 2007; ZHAO et al., 2008; MARUYAMA et al., 2012). A ferramenta Genomatix/Mainspector (CARTHARIUS et al., 2005) permitiu ainda observar a orientação (+/-) destes 16 gene em relação ao *cis*-elemento DRE, sendo positiva o sentido da transcrição do gene e negativa sentido inverso a transcrição (Fig. 07, Tab. 3).

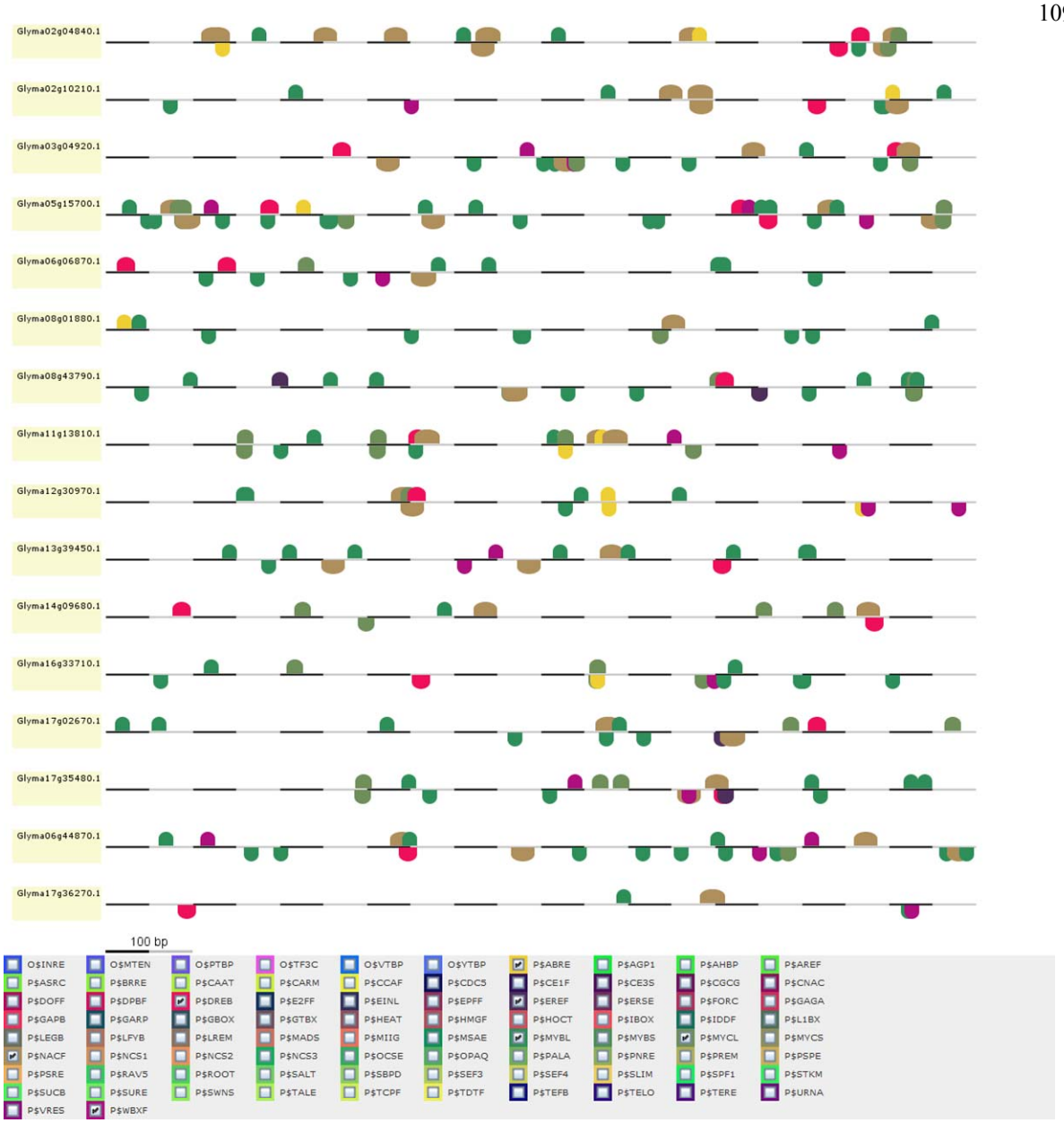


Fig. 7: Identificação da posição dos elementos *cis*-atuantes DRE, WRKY, MYB, MYC, AREB, bZIP, NAC, EREF (AP2) e orientação do gene (+/-) pelo programa Genomatix/Mainspector.

Dos 16 genes candidatos a regulação por *DREB1A*, 10 apresentaram perfil de expressão induzido e 6 com perfil reprimidos, para as duas linhagens. Apenas 3 genes, dos 16 genes em comum identificados, apresentaram perfil de expressão discrepante quando comparadas as duas linhagens (Fig. 8, Tab. 3).

Além do *motif* DRE, ao qual se liga o FT *DREB1A* desencadeando a ativação de genes de defesa celular, outros importantes *motifs* também foram identificados na região promotora dos 16 genes selecionados. Elementos conservados no processo de iniciação da transcrição como TATAbox (sequência de DNA de -25 a -30 pb anterior ao sítio de iniciação da transcrição em promotores de eucariotos) CAATbox e GCbox foram observados. Nestes locais, ocorre a ligação de fatores de transcrição aumentando a taxa de transcrição e

facilitando a montagem do complexo de iniciação. O complexo de iniciação da transcrição, em seguida, ativa a RNA polimerase para iniciar a transcrição de genes estresse responsivos, desencadeando respostas adaptativas em caso de condições ambientais adversas (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2005).

A determinação dos elementos *cis*-atuantes presentes na região promotora dos genes é importantes para se entender como os FTs se ligam a esses elementos atuando na ativação/regulação/modulação da expressão de genes estresses induzidos (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2005, UMEZAWA et al., 2006). No caso específico da atuação do *motif* DRE em resposta a seca, a análise funcional dos FTs que se ligam a ele proporcionará mais informações sobre as complexas redes reguladoras que estão envolvidas nas respostas a estresses abióticos e ainda conhecimentos sobre a sinalização dos diferentes caminhos metabólicos que a planta busca durante a adaptação vegetal à seca e a outros estresses (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

Sabe-se atualmente que existem duas vias de resposta a estresses abióticos, ativando genes de modo ABA dependente e independente. Os elementos DRE pertencem à rota de resposta ABA- independente e os ABRE ABA-dependente, ativando a expressão de genes responsivos a desidratação e ao frio (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006). No presente trabalho foram identificados diversos elementos *cis*-atuantes chaves que fazem parte da rede de sinalização ABA dependente e independente, entre eles *cis*-elementos DRE, W box, MYB, MYC, ABRE, bZIP, NAC, EREF (AP2) (Fig. 7).

Os elementos ABREs contém o domínio central ACGT, reconhecido por proteínas vegetais bZIP (CHOI et al., 2000; HOBO et al., 1999; UNO et al., 2000). Sistemas de sinalização ABA-dependente já foram descritos mediando a adaptação vegetal à seca pela ativação de proteínas bZIP, que se ligam aos elementos reguladores ABA-responsivos (ABREs) dos genes alvo e induzindo sua transcrição (BUSK e PAGÉS, 1998; SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000) e desencadeando respostas de defesa. Ainda na via ABA-dependente de respostas às condições ambientais, os fatores de transcrição MYC e MYB funcionam cooperativamente para regular a expressão de genes alvo (ABE et al.,1997). Os genes *AtMYB60* e *AtMYB96,* através da sinalização de ABA, regulam o movimento dos estômatos (COMINELLI, et al., 2005), repostas à seca e resistência a doenças (SEO et al., 2009; 2010). Os genes *AtMYC2* e *AtMYB2* foram descritos como induzidos pela seca e pelo tratamento ABA (ABE et al., 2003).

Já os membros da família do FT NAC são encontrados exclusivamente em plantas, tendo o domínio de ligação N-terminal altamente conservado (ERNST et al., 2004; OLSEN et

al., 2005; HU et al., 2006;. FANG et al., 2008). Estudos realizados em *Arabidopsis* e em arroz identificaram no sítio de ligação uma sequência de reconhecimento NAC (NACRS) com *motif* central CACG (SIMPSON et al., 2003; TRAN et al., 2004). Dos 16 genes apresentados neste estudo, 13 apresentaram o elemento *cis*-atuante NAC e o domínio MYB. He e co-autores (2006) propõem uma interação entre os membros da família NAC e MYB em respostas vegetais a estresses abióticos. Os FT NAC são proteínas com múltiplas funções envolvidas em uma grande variedade de processos relacionados a estresses abióticos tais como crescimento e formação de raiz lateral, espessamento da parede secundária e senescência (JOHN et al.,1997; DUVAL et al.,2002; HEGEDUS et al., 2003; HE et al., 2005; MITSUDA et al., 2007, TRAN et al., 2007), corroborando sua participação em resposta a condições ambientais não propícias ao desenvolvimento vegetal.

Ainda, o elemento Wbox funciona como elemento de ligação no DNA para superfamília de FT WRKYs, relacionados a múltiplas funções em plantas, inclusive resposta a estresses abióticos (DONG et al., 2003). Nove genes apresentaram o elemento Wbox, dos quais 7 foram induzidos e 2 reprimidos. Trabalhos mostram que a expressão de *OsWRKY45* em arroz foi regulada por desidratação, calor, frio e salinidade (QIU & YU, 2009). Em *Arabidopsis,* o gene *OsWRKY45* foi super expresso conferindo tolerância à seca. Os autores sugerem que o gene *OsWRKY45* pode estar envolvido na síntese de ABA, induzindo uma cascata de sinalização que fisiologicamente reduz a transpiração, resultando em uma maior tolerância à seca (QIU & YU, 2009).

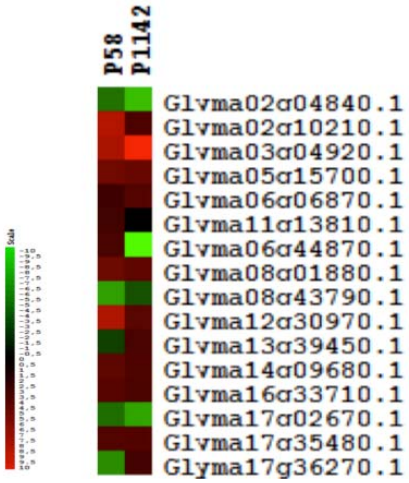


Fig. 8: Perfil de expressão dos genes candidatos à regulação gênica pelo fator de transcrição *DREB1A*. A primeira coluna apresenta os genes diferencialmente expressos identificados na linhagem GM P58 e a segunda coluna apresentada os genes diferencialmente expressos identificados na linhagem GM P1142.

Tabela 3:Genes diferencialmente expressos identificados em ambas linhagens GM contendo o cis-elemento DRE

Gene	Descrição	DRE	Posição	Regulação	*Fold change*
Glyma02g10210.1	Calcium binding protein	ACCGAC/A/GCCGAC	-6	up	6,5
Glyma03g04920.1	Protease inhibitor/seed storage/LTP family	ACCGAC/A/GCCGAC	-731	up	6,0
Glyma05g15700.1	Protein of unknown fuction	ACCGACA/GCCGAC	-240	up	3,3
Glyma06g06870.1	Cellulose synthase	ACCGACA/GCCGAC	-863	up	2,0
Glyma12g30970.1	alpha/beta hydrolase fold	ACCGAGA	-645	up	6,3
Glyma14g09680.1	Acyl CoA binding protein	ACCGACA/GCCGAC	-118	up	2,8
Glyma08g01880.1	Protein tyrosine kinase/MAPKK	ACCGACA/GCCGAC	-174	up	3,2
Glyma16g33710.1	Trypsin and protease inhibitor	ACCGACA/GCCGAC	-639	up	2,6
Glyma17g35480.1	Acyl CoA binding protein	ACCGACA/GCCGAC	-292	up	2,5
Glyma11g13810.1	Glycosyl hydrolase family 1	ACCGACA/GCCGAC	-644	up	2,1
Glyma02g04840.1	Arabidopsis protein of unknown function	A/GCCGAC	-159	down	3,4
		ACCGAC/A/GCCGAC	-94		
Glyma08g43790.1	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type	A/GCCGAC	-291	down	5,3
Glyma13g39450.1	Acyl CoA reductase	A/GCCGAC	-293	down	2,0
Glyma17g36270.1	Patatin-like phospholipase/Ca2+-independent phospholipase A2	ACCGACA/GCCGAC	-908	down	4,4
Glyma17g02670.1	Glutaredoxin and related proteins	A/GCCGAC	-185	down	3,3
Glyma06g44870.1	Ankyrin repeat-containing	ACCGAGA	-34	down	15,7
		ACCGAC/ A/GCCGAC	-654		

No presente trabalho, os genes identificados como diferencialmente expressos em plantas de soja sob condições ótimas de disponibilidade hídrica apresentaram elementos *cis* importantes em respostas a seca, sugerindo que esta rede de sinalização e resposta pode ser acionada a qualquer momento, desencadeando, no entanto em situações adversas, repostas mais pronunciadas do processo de defesa celular ao estresse (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI1, 1994). A análise do *Genomatix* que indicou o sentido da transcrição do gene será levada em consideração para a escolha dos genes candidatos a serem validados. Além disso, outros genes identificados neste trabalho como sendo diferencialmente expressos serão escolhidos para validação da tecnologia de microarranjos. Entretanto, novos genes poderão ainda ser identificados no microarranjo de plantas sob condições de deficiência hídrica e a compreensão da função destes genes auxiliará no maior entendimento dos mecanismos de manutenção celular em plantas de soja sob estresse de déficit hídrico.

6.5 Referências bibliográficas

ABE, H.; ITO, T.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. **The Plant Cell**, v.15, p.63–78, 2003.

AGARWALL, P. K & JHA, B. Transcription factors in plants and ABA-dependent and independent abiotic stress signalling. **Biologia Plantarum**, v.54, p.201-212, 2010.

ARAKI, S.; ITO, M.; SOYANO, T.; NISHIHAMA, R.; MACHIDA, Y. Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in tobacco. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.32979–88, 2004.

ATKINSON, N. J. & URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal Experimental of Botany**, v.63, p.3523–3543, 2012.

BHATNAGAR-MATHUR, D. S.; REDDY, M.; LAVANYA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHARMA, K. Stress-inducible expression of Arabidopsis thaliana DREB1A in transgenic peanut (Arachis hypogaea L.) increases transpiration efficiency under water-limiting conditions. **Plant Cell Report**, v.26, p.2071–2082, 2007.

BHATNAGAR-MATHUR, P.; DEVI, M. J.; VADEZ, V.; SHARMA, K. K. Differential antioxidative responses in transgenic peanut bear no relationship to their superior transpiration efficiency under drought stress**. Journal of Plant Physiology**, v.166, p.1207-1217, 2009.

BAILEY, T. L. & ELKAN, C. The value of prior knowledge in discovering motifs with MEME++. Technical Report CS95- 413, Department of Computer Science, University of California, San Diego, 1995b.

BENEVENTI, M.A. **Transformação genética em soja pela inserção da construção gênica contendo a região promotora do gene rd29a e a região codante do gene DREB1A de Arabidopsis thaliana, visando tolerância à seca**. 126 f. Dissertação, 2006.

BUSK, P. K.; PAGÈS, M. Regulation of abscisic acid-induced transcription. Plant **Molecular Biology**, v.37, p.425-435, 1998.

CHEN, F.; LI, Q.; SUN, L.; HE, Z. The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress. **DNA Research**, v.13, p.53-63, 2006.

CHOI, H.; HONG, J.; HA, J.; KANG, J.; KIM, S. Y. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. **Journal Biological Chemistry**, v.275, p.1723-1730, 2000.

COMINELLI, E.; GALBIATI, M.; VAVASSEUR, A.; CONTI, L.; SALA, T.; VUYLSTEKE, M.; LEONHARDT, N.; DELLAPORTA, S. L.; TONELLI, C. A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. **Current Biology**, v.15, p.1196–1200, 2005.

CHINNUSAMY, V., SCHUMAKER, K., ZHU, J. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.225-236, 2004.

DING, Z.; LI, S.; AN, X.; QIN, H.; WANG, D. Transgenic expression of MYB15 confers e hanced sensitivity to abscisic acid and improved drought tolerance in Arabidopsis thaliana thaliana. **Journal of Genetics e Genomics**, v.36, p.17-29, 2009.

DONG, J.; CHEN, C.; CHEN, Z. Expression profiles of the Arabidopsis thaliana WRKY gene superfamily during plant defense response. **Plant Molecular Biology**, v.51, p.21–37, 2003.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bull**, v.19, p.11-15, 1987.

DUBOUZET, J. G.; SAKUMA, Y.; ITO, Y.; KASUGA, M.; DUBOUZET, E. D.; MIURA, S.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Os-DREB genes in rice, Oryza sativa L.; encoded transcription activators that function in drought, high-salt and cold-responsive gene expression. **Plant Journal**, v.33, p.751-763, 2003.

DUVAL, M.; HSIEH, T. F.; KIM, S. Y.; THOMAS, T. L. Molecular characterization of AtNAM: a member of the Arabidopsis thaliana NAC domain superfamily. **Plant Molecular Biology**, v.50, p.237–248, 2002.

ERNST, H.A.; OLSEN, A.N.; LARSEN, S. & LO LEGGIO, L. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. **EMBO Report**, v.5, p.297–303, 2004.

FANG, Y.; YOU, J.; XIE, K.; XIE, W.; XIONG, L. Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. **Molecular Genetics and Genomics**, v.280, p.547–563, 2008.

FLAVELL, R. B. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.91, p.3490-3496, 1994.

GILMOUR, S. J.; ZARKA, D. G.; STOCKINGER, E. J.; SALAZAR, M. P.; HOUGHTON, J. M.; THOMASHOW, M. F. Low temperature regulation of the Arabidopsis thaliana CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. **Plant Journal**, v.16, p.433–443, 1998.

HE, X. J.; MU, R. L.; CAO, W. H.; ZHANG, Z. G.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y. AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. **Plant Journal**, v.44, p.903–916, 2005.

HEGEDUS, D.; YU, M.; BALDWIN, D.; GRUBER, M.; SHARPE, A.; PARKIN, I.; WHITWILL, S.; LYDIATE, D. Molecular characterization of Brassica napus NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. **Plant Molecular Biology**, v.53, p.383–397, 2003.

HOBO, T.; ASADA, M.; KOWYAMA, Y.; HATTORI, T. ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. The Plant Journal, v.19, p.679–689, 1999a.

HU, H.; DAI, M.; YAO, J.; XIAO, B.; LI, X.; ZHANG, Q.; XIONG, L. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.103, p.12987-12992, 2006.

JAGLO-OTTOSEN, K. R.; GILMOUR, S. J.; ZARKA, D. G.; SCHABENBERGER, O.; THOMASHOW, M. F. Arabidopsis thaliana CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. **Science**, v.280, p.104–106, 1998.

JAKOBY, M.; WEISSHAAR, B.; DROEGE-LASER, W.; VICENTE-CARBAJOSA, J.; TIEDEMANN, J.; KROJ, T.; PARCY, F. BZIP transcription factors in Arabidopsis. **Trends in Plant Science**, n.7, p.106–111, 2002.

JIA, Z.; LIAN, Y.; ZHU, Y.; HE, J.; CAO, Z.; WANG, G. Cloning and characterization of a putative transcription factor induced by abiotic stress in Zea mays. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p.6764-6771, 2009.

JOHN, I.; HACKETT, R.; COOPER, W.; DRAKE, R.; FARRELL, A.; Grierson, D. Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. **Plant Molecular Biology**, v.33, p.641–651, 1997.

ITO, Y.; KATSURA, K.; MARUYAMA, K.; TAJI, T.; KOBAYASHI, M.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. **Plant Cell Physiology**, v.47, p.141–153, 2006.

KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nature Biotechnology, v.17, p.287-291, 1999.

KASUGA, M.; MIURA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. A. Combination of the Arabidopsis DREB1A Gene and Stress-Inducible rd29A Promoter Improved Drought- and Low- Temperature Stress Tolerance in Tobacco by Gene Transfer. **Plant Cell Physiology**, v.45, p.346– 350, 2004.

KIRIK, V.; KO¨LLE, K.; MISE´ra, S.; BA¨UMLEIN, H. Two novel MYB homologues with changed expression in late embryogenesis-defective Arabidopsis mutants. **Plant Molecular Biology**, v.37, p.819–827, 1998.

KOHLI, A.; GRIFFTHS, S.; PALACIOS, N.; TWYMAN, R. M.; VAIN, P.; LAURIE D. A.; CHRISTOU, P. Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and conrms the predominance of micro homology-mediated recombination. **Plant Journal**, v.17, n.6, p. 591-601.

LATA, C. & PRASAD, M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. **Journal Experiment Botany**, (doi10.1093/jxb/err210), p.1-18, 2011.

LICAUSI, F.; VAN DONGEN, J. T.; GIUNTOLI, B.; NOVI, G.; SANTANIELLO, A.; GEIGENBERGER, P.; PERATA, P. HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in Arabidopsis thaliana. **Plant Journal**, v.62, p.302–315, 2010.

LIPPOLD. F.; SANCHES, D. H.; MUSIALAK, M.; SCHLERETH, A.;, SCHEIBLE, W. R.; HINCHA, D. K.; UDVARDI, M. K. AtMyb41 Regulates Transcriptional and Metabolic Responses to Osmotic Stress in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.149, p.1761-1772, 2009.

LI, X. P.; TIAN, A. G.; LUO, G. Z.; GONG, Z. Z.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses. **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.1355–1362, 2005.

LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain, separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low

temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis thaliana. **The Plant Cell**, v.10, p.1391–1406, 1998.

MANAVALAN, L. P.; GUTTIKONDA, S. K.; TRAN, L. S. and NGUYEN, H. T. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. **Plant Cell Physiology**, v.50, p.1260-1276, 2009.

MARTINS, M. T. B.; NEPOMUCENO, A. L.; MARCELINO, F. C.; FARIAS, J. R. B.; ABDELNOOR, R. V.; MARIN, S. R. R.; SILVEIRA, C. A.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; YAMANAKA, N; NAKASHIMA, K ; ROLLA, A. A. P.; BENEVENTI, M. A. ; STOLF, R. (2007). Caracterização molecular de eventos transformados com a construção rd29A: DREB1A. In: III Jornada Acadêmica da Embrapa Soja, 2007, Londrina. III Jornada Acadêmica da Embrapa Soja.

MARUYAMA, K.; SAKUMA, Y.; KASUGA, M.; ITO, Y.; SEKI, M.; GODA, H.; SHIMADA, Y.; YOSHIDA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis thaliana DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. **The Plant Journal**, v.38, p.982–993, 2004.

MARUYAMA, K.; TODAKA, D.; MIZOI, J.; YOSHIDA, T.; KIDOKORO, S.; MATSUKURA, S.; TAKASAK, H.; SAKURAI, T.; YAMAMOTO, Y. Y.; YOSHIWARA, K.; KOJIMA, M.; SAKAKIBARA, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Identification of Cis-Acting Promoter Elements in Cold- and Dehydration-Induced Transcriptional Pathways in Arabidopsis thaliana, Rice, and Soybean. **DNA Research**, v.19, p.37–49, 2012.

MUKHOPADHYAY, A.; VIJ, S.; TYAGI, A. K. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.101, p.6309–6314, 2004.

MSANNE, J.; LIN, J.; STONE, J. M.; AWADA, T. Characterization of abiotic stress-responsive Arabidopsis thaliana RD29A and RD29B genes and evaluation of transgenes. **Planta**, p.97-107, 2011.

NAKANO, T.; SUZUKI, K.; FUJIMURA, T.; SHINSHI, H. Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. **Plant Physiology**, v.140, p.411-432, 2006.

NAKASHIMA, K.; ITO, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Transcriptional Regulatory Networks in responsive to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. **Plant Physiology**, v.149, p.88-95, 2009.

NEWMAN, L. J.; PERAZZA, D. E.; JUDA, L.; CAMPBELL, M. M. Involvement of the R2R3-MYB, AtMYB61, in the ectopic lignification and dark-photomorphogenic components of the det3 mutant phenotype. **The Plant Journal**, v.37, p.239–50, 2004.

ROMANO, A.; VAN DER PLAS, L. H. W.; WITHOLT, B.; EGGINK, G., MOOIBROEK, H. Expression of poly-3-(R)-hydroxyalk-anoate (PHA) polymerase and acyl-CoA-transacylase in plastids of transgenic potato leads to the synthesis of a hydrophobic polymer, presumably medium-chain-length PHAs. **Planta**, v.220, p.45-464, 2005.

SALDANHA, A. Java Treeview—extensible visualization of microarray data. **Bioinformatics**, v.17, p.3246-3248, 2004.

SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. **The Plant Cell**, v.18, p.1292–1309, 2006.

SINGH, B.B. & MATSUI T. Breeding Cowpea Varieties for Drought Tolerance. In: Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea Production, Fatokun, C.A., S.A. Tarawali, B.B. Singh, P.M. Kormawa and M. Tamo (Eds.). IITA, Ibadan, p. 287-300, 2002.

SINGH, A. K.; SOPORY, S. K.; WU, R.; SINGLA-PAREEK, S. L. Transgenic Approaches. In: Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation, A Pareek, SK Sopory, HJ Bohnert and Govindjee (eds.), p.417–450, 2010.

SEO, P. J.; XIANG, F.; QIAO, M.; PARK, J. Y.; LEE, Y. N.; KIM, S. G.; LEE, Y. H.; PARK, W. J.; PARK, C. M. The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.151, p.275-289, 2009.

SEO, P. J.; PARK, C. M. MYB96-mediated abscisic acid signals induce pathogen resistance response by promoting salicylic acid biosynthesis in Arabidopsis thaliana. **New Phytologist**, v.186, p. 471-483, 2010.

SIMPSON, S.D.; NAKASHIMA, K.; NARUSAKA, Y.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K. and YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Two different novel cis-acting elements of erd1, a clpA homologous Arabidopsis gene, function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. **Plant Journal**, v.33, p.259–270, 2003.

SHARONI, A. M.; NURUZZAMAN, M.; SATOH, K.; SHIMIZU, T.; KONDOH, H.; SASAYA, T.; CHOI I. R.; OMURA, T.; KIKUCHI, S. Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. **Plant Cell Physiology**, v.52, p.344–360, 2011.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, p.217-223, 2000.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.2, p.221-227, 2007.

SUGANO, S.; KAMINAKA, H.; RYBKA, Z.; CATALA, R.; SALINAS, J.; MATSUI, K.; OHME-TAKAGI, M.; TAKATSUJI, H. Stress-responsive zinc finger gene ZPT2-3 plays a role in drought tolerance in petunia. **The Plant Journal**, v.36, p.830–841, 2003

OH, S. J.; SONG, S. I.; KIM, Y. S.; JANG, H. J.; KIM, S. Y.; KIM, M.; KIM, Y. K.; NAHM, B. H.; KIM, J. K. Arabidopsis thaliana CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. **Plant Physiology**, v.138, p.341–351, 2005.

OLSEN, A. N.; ERNST, H. A.; LEGGIO, L. L. and SKRIVER, K. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. **Trends Plant Science**, v.10, p.79–87, 2005.

OYA, T.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R.B.; TOBITA, S.; ITO, O. Drought tolerance characteristics of Brazilian soybean cultivars – evaluation and characterization of drought tolerance of various Brazilian soybean cultivars in the field. Plant Production. **Science**, v.7, p.129-137, 2004.

PASQUALI, G.; BIRICOLTI, S.; LOCATELLI, F.; BALDONI, E.; MATTANA, M. Osmyb4 expression improves adaptive responses to drought and clod stress in transgenic apples. **Plant Cell Reports**, v.27, p.1677-1686, 2008.

PELLEGRINESCHI, A.; REYNOLDS, M.; PACHECO, M.; BRITO, R. M.; ALMERAYA, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; HOISINGTON, D. Stress-induced expression in wheat of the Arabidopsis thaliana DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. **Genome**, v.47, p.493–500, 2004.

POLIZEL, A.; MEDRI, M. E.; NAKASHIMA, K.; YAMANAKA, N.; FARIAS, J. R.; OLIVEIRA, M. C. N.; MARIN, S. R. R.; ABDELNOOR, R. V.; MARCELINO-GUIMARAES, F. C.; FUGANTI, R.; RODRIGUES, F.A.; STOLF, R.; BENEVENTI, M. A.; ROLLA, A. A. P.; NEUMAIER, N.; YAMAGUCHI- SHINOZAKI, K.; CARVALHO, J. F. C.; NEPOMUCENO, A. L. Molecular, anatomical and physiological properties of a genetically modified soybean line transformed with rd29A:AtDREB1A for the improvement of drought tolerance. **Genetics and Molecular Research**, v.10, 2011.

QIN, F.; SAKUMA, Y.; LI, J.; LIU, Q.; LI, Y.Q.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in Zea mays L. **Plant and Cell Physiology**, v.45, p.1042–1052, 2004.

QIN, F.; KAKIMOTO, M.; SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; TRAN, L. S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in Zea mays L. **The Plant Journal**, v.50, p.54–69, 2007.

QIU, Y.; YU, D. Over-expression of the stress-induced OsWRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in Arabidopsis thaliana. **Environmental and Experimental Botany**, v.65, p.35–47, 2009.

THIMM, O.; BLASING, O.; GIBON, Y.; NAGEL, A.; MEYER, S.; KRUGER, P.; SELBIG, J.; MULLER, L. A.; RHEE, S. Y.; STITT, M. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. **Plant Journal**, v.37, p.914–939, 2004.

TIAN, C.; WAN, P.; SUN, S.; LI, J.; CHEN, M. Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, v.54, p.519–532, 2004.

TRAN, L.-S. P.; NAKASHIMA, K.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Plant gene networks in osmotic stress response: from genes to regulatory networks. **Methods in Enzymology**, v.428, p.109-128, 2007

UMEZAWA, T.; FUJITA, M.; FUJITA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. and SHINOZAKI, K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. **Current Opinion in Biotechnology**, v.17, p.113-122, 2006.

UNO, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis thaliana basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, p.11632–11637, 2000.

VANNINI, C.; LOCATELLI, F.; BRACALE, M.; MAGNALI, E.; MARSONI, M.; OSNATO, M.; MATTANA, M.; BALDONI, E.; CORAGGIO, I. Overexpression of the Rice Osmyb4 gene increases chilling and freezing tolerance of Arabidopsis thaliana plants. **The Plant Journal**, v.37, p.115-127, 2004.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; ELMAYAN, T.; FEUERBACH, F.; GODON, C.; MOREL, J. B.; MOURRAIN, P.; PALAUQUI, J.C.; VERNHETTES, S. Transgene-induced gene silencing in plants. **The Plant Journal**, v.16. p.51–659, 1998.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. & SHINOZAKI, K. Arabidopsis DNA encoding two desiccation-responsive rd29 genes. **Plant Physiology**, v.101, p.1119-1120, 1993.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K & SHINOZAKI, K. A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. **Plant Cell**, v.6, p.251–264, 1994.

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

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. & SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, v.57, p.781–803, 2006.

XIANG, Y.; TANG, N.; DU, H.; YE, H.; XIONG, L. Charaterization of Osb-ZIP23 as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. **Plant Physiology**, v.148, p.1938–1952, 2008.

YANHUI, C.; XIAOYUAN, Y.; KUN, H.; MEIHUA, L.; JIGANG, L.; ZHAOFENG, G.; ZHIQIANG, L.; YUNFEI, Z.; XIAOXIAO, W.; XIAOMING, Q.; YUNPING, S.; XIAOHUI, D.; JINGCHU, L.; XING-WANG, D.; ZHANGLIANG, C.; HONGYA, G.; LI-JIA, Q. The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. **Plant Molecular Biology**, v.60, p.107–124, 2006.

ZHAO, H.; LIU, W.; HU, Y.; LIU, X. L.; HE, Y. Cis-regulatory element-based genome-wide dentification of DREB1/CBF1 targets in Arabidopsis. **Progress in Natural Science**, v.18, p. 579–583, 2008.

ZHOU, Q. Y.; TIAN, A. G.; ZOU, H. F.; XIE, Z. M.; LEI, G.; HUANG, J.; WANG, C. M.; WANG, H. W.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y. Soybean WRKY-type transcription factor genes, GmWRKY13, GmWRKY21, and GmWRKY54, conferring tolerance to abiotic stresses intransgenic Arabidopsis plants. **Plant Biotechnology Journal**, v.6, p.486–503, 2008.

7 CONCLUSÃO

Análises de *Nothern blot* de linhagens de soja geneticamente modificadas com a construção *rd29A:AtDREB1A*, para tolerância a seca, confirmaram a expressão do transgene inserido ativada pela expressão basal do promotor estresse induzido *rd29A* em condições de boa disponibilidade hídrica.

Um grande número de genes diferencialmente expressos foi identificado em ambas às linhagens GMs P58 e P1142. A categorização funcional dos transcritos apontou a ativação de diferentes vias metabólicas, incluindo aquelas relacionadas à resposta a estresses abióticos. Dezesseis genes diferencialmente expressos em comum nas linhagens apresentaram a sequência DRE de ligação de fator de transcrição *DREB1A* na região promotora, classificando-os como potenciais alvos da regulação por *DREB1A*.

Dados fisiológicos de campo mostraram que as plantas GMs *DREB1A* não superaram a cultivar convencional BR 16 nos parâmetros de rendimentos, mas uma tendência de superioridade em componentes de produção ocorreu no tratamento de estresse hídrico na fase vegetativa.

Em casa de vegetação, as plantas *DREB1A* apresentaram menores taxas de transpiração em relação a cultivar BR 16, sugerindo que a estratégia de tolerância destas plantas possa incluir mecanismos de conservação de água no solo.