



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

JULIANE PRELA MARINHO

**CARACTERIZAÇÃO DE RESPOSTAS MOLECULARES E
FISIOLÓGICAS DE PLANTAS DE SOJA GENETICAMENTE
MODIFICADAS SUPER EXPRESSANDO O FATOR *AtAREB1*
SOB DÉFICIT HÍDRICO**

Londrina
2014



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agronômico do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Soja

JULIANE PRELA MARINHO

**CARACTERIZAÇÃO DE RESPOSTAS MOLECULARES E
FISIOLÓGICAS DE PLANTAS DE SOJA GENETICAMENTE
MODIFICADAS SUPER EXPRESSANDO O FATOR *AtAREB1*
SOB DÉFICIT HÍDRICO**

Londrina
2014

JULIANE PRELA MARINHO

**CARACTERIZAÇÃO DE RESPOSTAS MOLECULARES E
FISIOLÓGICAS DE PLANTAS DE SOJA GENETICAMENTE
MODIFICADAS SUPER EXPRESSANDO O FATOR *AtAREB1*
SOB DÉFICIT HÍDRICO**

Dissertação 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 Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Lima
Nepomuceno

Co-orientadora: Dr^a Josirley de Fátima Côrrea
Carvalho

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M338c Marinho, Juliane Praela.

Caracterização de respostas moleculares e fisiológicas de plantas de soja geneticamente modificadas super expressando o fator *AtAREB1* sob déficit hídrico / Juliane Praela Marinho. – Londrina, 2014.
xi, 91 f. : il.

Orientador: Alexandre Lima Nepomuceno.

Coorientador: Josirley de Fátima Corrêa Carvalho.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Soja – Condições hídricas – Teses. 2. Soja – Genética molecular – Teses. 3. Expressão (Genética) – Teses. 4. Ácido abscísico – Teses. 5. Plantas transgênicas – Teses I. Nepomuceno, Alexandre Lima. II. Carvalho, Josirley de Fátima Corrêa. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Instituto Agrônomo do Paraná. V. EMBRAPA. VI. Título.

CDU 631.52:633.34

JULIANE PRELA MARINHO

**CARACTERIZAÇÃO DE RESPOSTAS MOLECULARES E
FISIOLÓGICAS DE PLANTAS DE SOJA GENETICAMENTE
MODIFICADAS SUPER EXPRESSANDO O FATOR *AtAREB1* SOB
DÉFICIT HÍDRICO**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Lima
Nepomuceno
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– EMBRAPA/Soja

Dr^a. Liliane Marcia Mertz Henning
Empresa Brasileira de Pesquisa
EMBRAPA/Soja

Dr. Hugo Bruno Correa Molinari
Empresa Brasileira de Pesquisa –
EMBRAPA/Agroenergia

Londrina, 28 de Fevereiro de 2014.

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus amados pais (José Mario e Vanderli). Honrai o vosso pai e a vossa mãe, a fim de viverdes longo tempo sobre a terra que o Senhor vosso Deus vos dará. (Decálogo: Êxodo, 20:12).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar comigo em todos os momentos, sempre abrindo portas e me guiando para o caminho correto;

Aos meus pais, essenciais em todas as fases de minha vida, pela educação, carinho e amor dados a mim. Aos meus irmãos Junior e Neto, pelo apoio e incentivo fornecidos no decorrer de minha trajetória;

Ao meu noivo Douglas, a quem “ADMIRO” muito, por estar sempre presente em momentos importantes de minha vida, sendo estes de alegria ou tristeza, me apoiando e aconselhando. Seu apoio foi essencial para essa conquista. Amo muito você;

À minha co-orientadora Dr^a Josirley de Fatima Correa Carvalho e ao meu “co-orientador” Dr. Leonardo Cesar Ferreira, agradeço pela amizade e pelos ensinamentos e correções do trabalho. Vocês são modelos de profissionais a serem seguidos, deixo aqui meu reconhecimento e admiração por vocês;

Ao Dr. Alexandre Lima Nepomuceno, pela oportunidade de ter sido sua orientada;

Aos amigos e parceiros do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e, equipes de Ecofisiologia e Agrometeorologia da Embrapa Soja, pela grande ajuda;

As minhas amigas Adriély, Cristina e Myriam, pessoas especiais sempre presentes em minha vida, obrigada pela amizade e ótimos momentos juntas. A uma AMIGA especial, a quem dedico todos os anos de faculdade, por ter sido uma ótima companheira de curso, de estágio e de “república”. Saudades eternas de você Hitomi (*in memoriam*);

Em especial à Juliana Leite, Silvana, Cibelli, Aguida Morales, Adriana Polizel Podanosqui, Renata Fuganti Pagliarini, Fabiana A. Rodrigues e Rafaela Freitas, companheiras e amigas sempre dispostas a ajudar;

A Universidade Estadual de Londrina (UEL), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (CAPES) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -Embrapa Soja pelo apoio financeiro, concessão da bolsa e disponibilização da estrutura física para a realização deste trabalho, respectivamente.

TODO CARINHO E AGRADECIMENTO

MARINHO, Juliane Prael. **Caracterização de respostas moleculares e fisiológicas de plantas de soja geneticamente modificadas com 35S-AtAREB1 sob déficit hídrico**. 2014. 91f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

Mundialmente, a perda de grãos devido a fatores bióticos e abióticos é alta, o que compromete a produtividade média das culturas e afeta negativamente aspectos econômico-financeiros de um país. O déficit hídrico é o estresse ambiental mais importante. A tolerância à seca é um mecanismo complexo, envolvendo modificações fisiológicas e moleculares que agem na percepção e resposta ao estresse. O ácido abscísico (ABA) é o principal transdutor de sinal que confere tolerância a estresses abióticos em plantas. Em estudos de *Arabidopsis thaliana*, o fator de transcrição ABA-dependente bZIP AREB1 ativaram genes envolvidos na defesa celular à desidratação e aumentaram a tolerância à seca. Objetivou-se no presente estudo caracterizar as respostas moleculares e fisiológicas de plantas de soja geneticamente modificadas com 35S-AtAREB1 sob condições de déficit hídrico. Os resultados mostraram que a expressão do transgene AtAREB1 sob controle do promotor CaMV 35 não resultou em retardo no crescimento. Dois eventos transgênicos tiveram melhor performance em experimentos de sobrevivência e rendimento, além de que as análises do potencial hídrico revelaram que tais linhagens armazenaram maior quantidade de água no substrato. Sugere-se que os eventos 1Ea2939 e 1Ea2889 apresentam mecanismo de evitamento à seca em razão da manutenção das trocas gasosas sob déficit hídrico causado por menores taxas de transpiração e conservação de água no substrato.

Palavras-chave: Ácido abscísico. Estresses abióticos. *Glycine max*. Organismos geneticamente modificados.

MARINHO, Juliane Praela. **Characterization of molecular and physiological responses of soybean plants genetically modified with 35S-AtAREB1 under water deficit.** 2014. 91p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Worldwide, grain loss due to biotic and abiotic factors is high, which compromises the average crop productivity and negatively affects economic and financial aspects of a country. Drought is the most important environmental stress. Drought tolerance is a complex mechanism, involving physiological and molecular changes that act on the perception and response to stress. The abscisic acid (ABA) is the primary signal transducer that confers tolerance to abiotic stress in plants. In studies of *Arabidopsis thaliana*, the transcription factor ABA-dependent bZIP AREB1 activated genes involved in cellular defense to dehydration and increased drought tolerance. The objective of this study was to characterize the molecular and physiological responses of plants genetically modified soybeans with 35S-AtAREB1 under water deficit conditions. The results showed that AtAREB1 transgene expression under control of CaMV 35 did not result in growth retardation. Two transgenic events had better survival and yield, besides, analyzes of water potential showed that these genotypes stored more water in the substrate. It is suggested that 1Ea2939 1Ea2889 events presents drought avoidance because of the maintenance of gas exchange under water deficit caused by lower transpiration rates and conservation of water in the substrate.

Keywords: Abscisic acid. Abiotic stresses. Glycine max. Genetically modified organisms.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura. 1 - Modelo para regulação de sinalização de ABA em resposta ao déficit hídrico.** Em situações não estressadas, as PP2Cs se ligam as SRK2D/E/I (Park et al., 2009). Em resposta ao déficit hídrico, ABA é produzido para a ativação das SRK2D/E/I via complexo receptor de ABA PP2C-PYR/PYL/RCAR (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Com a regulação positiva das SRK2D/E/I os genes *downstream* são ativados. Dentre eles os fatores de transcrição (TFs), PP2Cs do tipo HAI1, e LEAs. Consequentemente, as PP2Cs se ligam as SRK2D/E/I para afinar a sinalização de ABA em resposta ao déficit hídrico. Adaptado de Fujita et al. (2009)29
- Fig. 2 - Visão geral da sensibilidade, sinalização e transporte de ABA.** a) PYR/PYL/RCAR-PP2C-SnRKs formam o complexo principal de sinalização (circulo amarelo). Na ativação no núcleo, o complexo regula diretamente a expressão gênica ABA-responsiva por fosforilação dos fatores de transcrição AREB/ABF. Na ativação no citoplasma, o complexo pode acessar a membrana plasmática e fosforilar canais de ânions (SLAC1) ou canais de potássio (KAT1) para induzir o fechamento estomático em resposta ao ABA. b) O sistema de transporte de ABA consiste em dois tipos de transportadores ABC, para influxo ou para efluxo. O movimento de ABA está indicado por linhas verdes e flechas, e as principais vias de sinalização estão indicadas por linhas vermelhas e flechas. Linhas pontilhadas indicam conexões indiretas ou não confirmadas. Adaptado e traduzido de Umezawa et al., (2010).....31

CAPÍTULO 2

- Figura 1** - Condutância estomática de plantas *AtAREB* geneticamente modificadas e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16). a) controle. b) déficit hídrico. Valores representam médias \pm erro padrão; número de repetições = 9. Em cada condição hídrica, médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste Duncan ($p \leq 0.05$).....59
- Figura 2** - Concentração intercelular de CO₂ e taxa fotossintética de plantas *AtAREB* geneticamente modificadas e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16). a) Concentração intercelular de CO₂ de plantas sob controle. b) Concentração intercelular de CO₂ de plantas sob déficit hídrico. c) Taxa fotossintética de plantas sob controle. d) Taxa fotossintética de plantas sob déficit hídrico. Valores representam médias \pm erro padrão; número de repetições = 9. Em cada condição hídrica, médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$).....60
- Figura 3** - Transpiração diária das plantas *AtAREB* geneticamente modificadas e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16) sob déficit hídrico. Valores representam médias \pm erro padrão, n=10.....62
- Figura 4** - Potencial hídrico do substrato usado para o cultivo de plantas *AtAREB* geneticamente modificadas e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16) sob déficit hídrico. Valores representam médias \pm erro padrão, número de repetições = 5. Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$)63

- Figura 5 - Características fenotípicas de plantas *AtAREB* geneticamente modificadas para tolerância à seca e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16).** a) número de plantas apresentando botões florais em 19/04/2013. b) número de plantas apresentando botões florais em 22/04/2013.....64
- Figura 6 -** Respiração das plantas *AtAREB* geneticamente modificadas e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16) sob déficit hídrico. Valores representam médias \pm erro padrão, número de repetições = 9.....65
- Figura 7 -** Nível de expressão do transgene *AtAREB1* na cultivar BR 16 e em eventos GMs 1Ea15, 1Ea2939, 1Eb2889 em controle (C) e déficit hídrico (DH). A expressão foi normalizada com o gene de referência *Gm β -actina*. Valores representam médias \pm erro padrão; número de repetições = 966
- Figura 8 -** Nível de expressão do gene *GmRAB18* na cultivar BR 16 e em eventos GMs 1Ea15, 1Ea2939, 1Eb2889 em controle (C) e déficit hídrico (DH). A expressão foi normalizada com o gene de referência *Gm β -actina*. Valores representam médias \pm erro padrão; número de repetições = 967
- Figura 9 -** Nível de expressão do gene *GmPP2* e *GmSnRK2* na cultivar BR 16 e em eventos GMs 1Ea15, 1Ea2939, 1Eb2889 em controle (C) e déficit hídrico (DH). A expressão foi normalizada com o gene de referência *Gm β -actina*. Valores representam médias \pm erro padrão; número de repetições = 9.....69
- Figura 10** Nível de expressão do gene (a) *GmPP2* e (b) *GmSnRK2* na cultivar BR 16 e em eventos GMs 1Ea15, 1Ea2939, 1Eb2889 para plantas cultivadas em condições controle em que as temperaturas foliares atingiram 27 e 34°C. A expressão foi

normalizada com o gene de referência *Gmβ-actina*. Valores representam médias ± erro padrão; número de repetições = 9.....70

Figura 11 Taxa de sobrevivência de plantas *AtAREB* geneticamente modificadas para tolerância à seca e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16). Estas plantas ficaram sem irrigação por 17 dias. Na foto, pode-se observar que após 7 a re-irrigação as plantas BR 16 e 1Ea15 não apresentaram recuperação, diferentemente dos eventos GMs 1Ea 2939 e 1Eb2889.....71

Figura 12 Componentes de rendimento (por planta) de linhagens *AtAREB* geneticamente modificadas para tolerância à seca e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16). a) número total de vagens. b) massa seca total de vagens. c) número de sementes viáveis. d) massa seca de sementes viáveis. Valores representam médias ± erro padrão; n=9 plantas. Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$).....73

Figura 13 Componentes de rendimento (por planta) de linhagens *AtAREB* geneticamente modificadas para tolerância à seca e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16). e) massa seca de sementes inviáveis; f) número total de sementes; g) número total de sementes inviáveis; h). Valores representam médias ± erro padrão; n=9 plantas. Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$).....74

ANEXOS

- Figura 1** - Mapa de restrição do plasmídio pBI221 com o inserto transformado via biobalística (promotor 35S + AREB1 + terminador NosT): pBI35SΩ:AtAREB1 ou 35S:AREB184
- Figura 2** - Mapa de restrição do plasmídio pC3300J com o inserto transformado via *Agrobacterium tumefaciens* (promotor 35S + AREB1 + terminador NosT): pC3300J35SΩ:AtAREB1 ou 35S:AREB185
- Figura 3** - **Plantas positivas para o transgene alvo AtAREB1.** Todas as plantas T₃ dos eventos 1Ea15, 1Ea2939 e 1Eb2889, utilizados para o experimento de análise dos genes da cascata de AtAREB1 foram positivas para o transgene inserido. M: Marcador molecular 1kb plus, a: corresponde ao controle positivo (plasmídeo com a construção de AtAREB1), b: controle positivo (planta com AtAREB1), c: controle positivo (planta com AtAREB1), d: controle negativo BR 16, e: branco. Nesta figura os fragmentos foram amplificados utilizando o conjunto de iniciador 7 que amplifica um fragmento de 639 pb86
- Figura 4** - **Determinação da eficiência do sistema Sybr green para os genes alvos.** Um bulk de amostras foi diluído serialmente 5x e as diferentes diluições foram amplificadas em sistema Sybr green para os genes alvos e o endógeno. Os valores de Ct foram plotados em função do logaritmo da diluição. O eixo y corresponde aos valores de Ct e eixo x log da diluição. **A)** Eficiência do gene AtAREB1 com slope = -3,3507. **B)** Eficiência do gene GmPP2C com slope = 3,5005. **C)** Eficiência do gene GmSRK2 com slope = 3,4844. **D)** Eficiência do gene GmRAB18 com slope = 3,30188

Figura 5 -	Determinação da eficiência do sistema <i>Sybr green</i> para os alvos. Um bulk de amostras foi diluído serialmente 5x e as diferentes diluições foram amplificadas em sistema <i>Sybr green</i> para os alvos e o endógeno. Os valores de Ct foram plotados em função do logaritmo da diluição. O eixo y corresponde aos valores de Ct e eixo x log da diluição. E) Eficiência do gene de referência endógena <i>Gmβ-actina</i> com <i>slope</i> = 3,2018.....	89
Figura 6 -	Curva de dissociação da reação de eficiência do <i>primer</i> de <i>AtAREB1</i> usado na quantificação relativa dos transgenes por RT-qPCR.....	90
Figura 7 -	Curva de dissociação da reação de eficiência do <i>primer</i> de <i>GmRAB18</i> usado na quantificação relativa dos transgenes por RT-qPCR.....	90
Figura 8 -	Curva de dissociação da reação de eficiência do <i>primer</i> de <i>PP2C</i> usado na quantificação relativa dos transgenes por RT-qPCR.....	91
Figura 9 -	Curva de dissociação da reação de eficiência do <i>primer</i> de <i>SRK2</i> usado na quantificação relativa dos transgenes por RT-qPCR.....	91

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1** - Parâmetros de crescimento de plantas de soja *AtAREB* geneticamente modificadas e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16)57
- Tabela 2** - Taxa de crescimento por dia de plantas de soja *AtAREB* geneticamente modificadas e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16)58
- Tabela 3** - Número de nós de plantas de soja *AtAREB* geneticamente modificadas e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16)58

ANEXOS

- Tabela 1** - Sequência do *primer* usado na reação de PCR convencional e tamanho esperado dos fragmentos amplificados84
- Tabela 2** - Identificação e sequências de iniciadores utilizados na análise de expressão87
- Tabela 3** - Sequência do *primer* β -actina íntron usado na reação de PCR convencional para verificar a eficiência do tratamento com DNase e síntese de cDNA87

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	16	
1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1.	Objetivo Geral	18
2.2.	Objetivos Específicos.....	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1.	Soja, Estresses Abióticos e Biotecnologia	19
3.2.	Mecanismos de respostas ao déficit hídrico	21
3.2.1.	Mecanismos fisiológicos e morfo-anatômicos.....	21
3.2.2.	Mecanismos moleculares.....	23
3.2.2.1.	Genes envolvidos na resposta das plantas a estresses abióticos.....	25
3.2.2.2.	Ácido abscísico e seu complexo de sinalização	28
3.2.2.3.	Fatores de Transcrição AREB	33
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DE RESPOSTAS MOLECULARES E FISIOLÓGICAS DE PLANTAS DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADAS COM 35S-AtAREB1 SOB DÉFICIT HÍDRICO	47	
RESUMO.....	47	
INTRODUÇÃO	49	
MATERIAL E MÉTODOS	50	
Material Vegetal	50	
Análise da expressão de genes induzidos por AtAREB1	50	
Análise da expressão de transcritos por RT-qPCR.....	52	
Parâmetros de florescimento e rendimento.....	54	
Análise da taxa de sobrevivência e transpiração	54	

Análise de crescimento	55
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
CONCLUSÕES	75
Considerações finais e perspectivas futuras	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Apesar da soja não ser uma espécie nativa em nosso território, esta cultura encontra-se bem adaptada ao clima brasileiro. Na safra 2012/13, o Brasil se tornou o maior produtor mundial, ultrapassando os Estados Unidos, chegando a uma produção de 81,94 milhões de toneladas (CONAB, 2013). Não só em nosso país, mas mundialmente, fatores bióticos e abióticos comprometem a produtividade de várias culturas de grãos e afetam negativamente aspectos econômico-financeiros. Dentre estes fatores, o déficit hídrico é o fator ambiental mais importante (Yang et al., 2010). Com base nas mudanças climáticas atuais e nos cenários previstos para os próximos anos, os quais consideram o aumento da temperatura global e da frequência de eventos de seca, pesquisas visando o desenvolvimento de plantas tolerantes à seca são de fundamental importância e urgência.

Recentes avanços na Genômica Vegetal têm permitido identificar, isolar e analisar as funções de genes, cujos produtos codificam para proteínas envolvidas na regulação da homeostase iônica, ajustamento osmótico e desintoxicação celular (Umezawa et al., 2006) elucidando, assim, funções importantes de genes envolvidos na tolerância a estresses ambientais. Nesse contexto, a Biotecnologia auxilia a obtenção de cultivares mais tolerantes a estresses ambientais (Takeda e Matsuoka, 2008).

Entre as proteínas regulatórias, os fatores de transcrição desempenham um papel crucial na transdução de sinal ao receberem sinais *upstream* e ativarem a expressão de genes *downstream* induzidos por estresse. Neste sentido, o fator de transcrição *AREB1* (*Abscisic acid – Responsive Element Binding protein*), pertencente à família bZIP (zíper de leucina básico), é uma proteína responsiva ao Ácido Abscísico (ABA), que ativa em cascata a expressão de genes envolvidos em defesas celulares contra a dessecação, aumentando assim a tolerância à seca.

As respostas moleculares das plantas aos estresses abióticos têm sido descritas na literatura como um processo complexo baseado principalmente na

modulação da atividade transcricional de genes relacionados ao estresse (Mazzucotelli et al., 2008). Assim, estudos recentes vêm elucidando a via de sinalização ABA-dependente em resposta ao déficit hídrico. Neste processo de sinalização celular, a percepção da perda de água pelas plantas provoca acúmulo de ABA, o que resulta na inibição de fosfatases PP2Cs e a ativação de quinases SnRKs, responsáveis por fosforilar os fatores de transcrição ABF (bZIPs). Desta forma, ocorre a regulação da expressão de genes ABA-dependentes e conseqüentemente o fechamento estomático (Bhaskara et al., 2012). Esta rede de interações confere, portanto, melhor aclimatabilidade a ambientes com disponibilidade hídrica restrita.

Estudos recentes têm demonstrado a importância e o potencial de proteínas *AREB1* e bZIP no aumento da tolerância ao déficit hídrico (Fujita et al., 2011; Gao et al., 2011; Kim et al., 2011; Reeves et al., 2011). Além disso, a superexpressão constitutiva de *AREB1/ABF2*, *ABF3* ou *ABF4* em *Arabidopsis* resultou no aumento de tolerância à seca (Fujita et al. 2005; Kang et al. 2002). Por sua vez, a superexpressão do tipo *ABF2* em *Arabidopsis* promoveu a tolerância à seca e aos estresses salino, térmico e oxidativo (Kim et al. 2004). Em adição, Barbosa et al. (2012) reportaram que plantas de soja co-transformadas com as construções *35S:AtAREB1* e *35S:ahas* tiveram maior taxa de sobrevivência e menor dano foliar após 5 dias de déficit hídrico, apresentando ainda, ainda melhor crescimento, condutância estomática e fotossíntese.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivos caracterizar o perfil de expressão de genes *upstream* e *downstream* ao fator de transcrição *35S:AtAREB1* introduzido em embriões da cultivar convencional BR 16, bem como caracterizar as linhagens originadas quanto a parâmetros fitométricos, fisiológicos e agrônômicos sob déficit hídrico.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar respostas moleculares, fitométricas, fisiológicas e agronômicas de plantas de soja geneticamente modificadas com *35S-AtAREB1* sob condições de déficit hídrico.

2.2. Objetivos Específicos

- Quantificar, em plantas de soja transformadas com *35S-AtAREB1* e na sua isolinha, a cultivar convencional BR 16, a expressão de genes da cascata tais como: *35S-AtAreb1*, fosfatase *GmPP2C* (Glyma14g37480), quinase *GmSRK2* (Glyma02g15330), *GmRAB18* (Glyma09g31740), em condições bem-irrigadas e sob déficit hídrico via RT-qPCR;
- Comparar as plantas transgênicas de soja *35S-AtAREB1* e sua isolinha, a cultivar BR 16, nas diferentes condições hídricas com a relação a:
 - a) medidas de trocas gasosas: taxa fotossintética, condutância estomática e concentração intercelular de CO₂;
 - b) parâmetros fenotípicos: número de nós, área foliar total e florescimento;
 - c) parâmetros de crescimento: taxa de crescimento relativo e taxa de crescimento relativo por dia;
 - d) parâmetros de rendimento (por planta): número total de vagens, número total de sementes, massa seca total de vagens, número de sementes, massa seca de sementes, massa seca total de sementes, excluindo-se as mal formadas.
 - e) taxa de sobrevivência e transpiração diária.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Soja, Estresses Abióticos e Biotecnologia

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma cultura de origem asiática que foi introduzida no Brasil em 1882. Após vários estudos realizados pela Escola Agrônômica da Bahia e pelo Instituto Agrônômico de Campinas, sementes de soja foram disseminadas por todo o país e, na década de 1970, o cultivo da leguminosa se tornou uma estratégia econômica devido ao destacado aumento de seu preço no mercado mundial (CI SOJA, 2010).

O versátil grão origina vários produtos e subprodutos na agroindústria, na indústria química e na de alimentos, além de ser fonte de proteínas, macronutrientes e outros metabólitos secundários como isoflavonas (Sakai e Kogiso, 2008) e fitoestrógenos (Ososki e Kenelly, 2003). Adicionalmente, a soja é uma cultura atrativa para a produção de biocombustíveis (EMBRAPA, 2011).

Apesar de não ser uma espécie endêmica do território nacional, a oleaginosa está bem aclimatada ao clima brasileiro, tanto que na safra última (2012/13), o Brasil se tornou o maior produtor mundial, ultrapassando os Estados Unidos, e chegou a uma produção de 81,94 milhões de toneladas (CONAB, 2013). Nosso país possui alta competitividade em termos técnicos porque, mesmo com um crescimento anual da ordem de 5,83% na área cultivada com a oleaginosa, a produtividade continuou crescendo à taxa de 2,24% ao ano, superiores às observadas nos demais países. Este fato demonstra que o Brasil ainda possui recursos naturais em excelentes condições que podem ser incorporados ao processo produtivo sem causar nenhum comprometimento dos resultados técnicos. Tal crescimento significativo na produtividade deve-se, também, ao fato do país, ao longo das últimas décadas, ter realizado importantes investimentos na geração e difusão de tecnologias de alto nível, visando adequá-las à exploração da soja em diversas regiões (Lazzarotto e Reis, 2009).

Mesmo com números positivos e crescentes, a produtividade de diversas culturas pode ser limitada por fatores bióticos e abióticos, dentre os quais o déficit hídrico tem sido responsável por reduzir consideravelmente os rendimentos de grãos, especialmente durante a fase reprodutiva, resultando

em perdas financeiras significativas aos produtores (EMBRAPA, 2005). Plantações afetadas por períodos de déficit hídrico podem ter sua produtividade reduzida em até 40% (Tran et al., 2010).

Na cultura da soja, a baixa disponibilidade hídrica prejudica a obtenção de uma boa uniformidade na população de plantas no período entre a germinação e a emergência e entre a floração e o enchimento de grãos, provocando ainda alterações fisiológicas como o fechamento estomático e o enrolamento de folhas. Como consequência, há queda prematura de folhas e flores e abortamento de vagens, resultando em redução no rendimento de grãos. Na fase vegetativa, a seca reduz o crescimento e a área foliar e, na reprodutiva, além das reduções mais drásticas no rendimento, ocorre também o adiantamento na maturação, o que resulta em menor acúmulo de matéria seca, vagens vazias e “chochamento” de grãos (Bonato, 2000). Desclaux et al. (2000) também reportaram que o déficit hídrico pode acelerar a passagem do período vegetativo para o reprodutivo, além de poder levar ao desenvolvimento de menor número de nós, antecipação da formação de flores e vagens e encurtamento da fase reprodutiva, acarretando diminuição do período de enchimento de grãos.

A preocupação com as consequências do déficit hídrico não ocorre apenas nacionalmente. Muitas áreas produtoras mundiais também vêm sendo afetadas e a expectativa futura é de que este problema aumente nas próximas décadas em decorrência, principalmente, das mudanças climáticas globais (Burke et al., 2006).

Algumas estratégias para minimizar as perdas causadas pela seca podem e devem ser utilizadas separadamente ou em conjunto. Estas vão desde o manejo adequado da cultura até o uso de ferramentas de engenharia genética aliadas aos métodos convencionais de melhoramento, objetivando-se neste caso a obtenção de cultivares mais tolerantes a períodos de déficit hídrico (Sharma e Lavanya, 2002). Uma estratégia que vem sendo utilizada com este objetivo é a transformação de plantas com fatores de transcrição que regulam a expressão de vários genes relacionados a estresses abióticos.

Dentre vários outros, o fator de transcrição AREB constitui uma das peças regulatórias que ativam a cascata de expressão de genes responsivos a estresses. Por meio de técnicas de recombinação do DNA, que permitem a

inserção de genes exógenos de interesse em organismos vegetais, os pesquisadores podem observar comparativamente as respostas das plantas GMs em relação às plantas não-transformadas sob determinadas condições de estresse e, assim, avaliar a influência de efeitos pleiotrópicos e/ou deletérios na resposta aclimatativa de tais plantas.

3.2. Mecanismos de respostas ao déficit hídrico

3.2.1. Mecanismos fisiológicos e morfo-anatômicos

Na natureza, a seca é o principal fator responsável por afetar o crescimento e a produtividade das plantas. A insuficiência hídrica leva à ocorrência de inúmeras modificações fisiológicas, morfológicas e metabólicas em todos os órgãos vegetais (Klamkowski e Treder, 2006). Estas alterações incluem entre outras, fechamento estomático, repressão do crescimento celular e da fotossíntese e o aumento da respiração (Shinozaki et al., 2007). O desenvolvimento destes mecanismos ao longo do processo evolutivo foi a principal defesa vegetal frente a situações de estresse, uma vez que as plantas são organismos sésseis e, portanto são incapazes de se refugiarem de situações ambientais adversas (Raghavendra et al., 2010).

Uma das primeiras respostas ao déficit hídrico é a diminuição da condutância estomática, que reduz a perda de água e limita a difusão de CO₂ para os cloroplastos (Frederick et al., 1989). Nas folhas, o aumento da concentração de ABA além de diminuir a condutância estomática pode reduzir a área foliar durante o déficit hídrico. Estes efeitos do ABA nas folhas podem indicar diminuição da taxa de transpiração, mecanismo que previne a desidratação dos tecidos foliares e aumenta a chance de sobrevivência sob seca prolongada (Bahrun et al. 2002; Liu et al. 2003, Liu et al. 2005). Em resumo, a percepção pelas raízes da redução do potencial hídrico do substrato promove a síntese e o acúmulo de ABA, que é transportado à parte aérea via xilema e atua como um sinalizador químico para diminuição da condutância estomática (Liu et al., 2005). Segundo Wittenmayer e Merbach (2005), os efeitos do ABA e do déficit hídrico são similares, de modo que a diminuição da condutância estomática pode ocorrer devido a sinais hidráulicos (potencial de

água na folha e turgor celular) e/ou sinais químicos (ABA). No entanto, a maioria das pesquisas sugere uma combinação de sinais que podem ocorrer juntos ou em tempos diferentes (Comstock, 2002; Kalefetoğlu e Ekmekçi, 2005).

A diminuição da condutância estomática contribui para manter alto potencial hídrico foliar, mas provoca, em contrapartida, diminuição na atividade fotossintética, limitando a assimilação de CO₂. O transporte de elétrons na fotossíntese e a capacidade de fosforilação nos cloroplastos são reduzidos em plantas expostas ao déficit hídrico. A inibição das reações na cadeia de transporte de elétrons pode formar espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*), as quais podem causar prejuízos fotooxidativos e fotoinibição (Kalefetoglu e Ekmekçi, 2005).

Além disso, sob condições de déficit hídrico as plantas também apresentam alguns mecanismos morfológicos de adaptação que previnem a perda de água para o ambiente e mantém a hidratação. Estas respostas incluem o desenvolvimento de tricomas e pêlos radiculares, redução da área foliar e abscisão foliar induzida em grande parte pela síntese de etileno, o que permite diminuir a transpiração, além de mudanças no tamanho, orientação das folhas e interceptação da radiação solar por meio do paraheliotropismo. Este movimento altera o ângulo foliar, minimizando a superfície exposta ao sol para a manutenção da temperatura foliar (Isoda e Wang, 2002; Taiz e Zeiger, 2004).

Estudos têm demonstrado que o ABA provê ainda o crescimento da raiz via supressão do acúmulo do etileno e desta forma contribui para a condutividade hidráulica aumentando a atividade das aquaporinas, proteínas transportadoras de água localizadas nas membranas celulares (Sharp, 2002). Assim, um sistema radicular mais profundo é mais bem adaptado à captação constante de água. Em solos com baixo potencial hídrico, as raízes também apresentam adaptações anatômicas importantes como suberização e lignificação da parede celular (Javot e Maurel, 2002).

As estratégias de resposta vegetal ao déficit hídrico são classificadas em três grupos distintos: escape, evitamento e tolerância à seca (Turner et al., 2001). O escape permite que a planta complete seu ciclo de vida antes do período de déficit hídrico acontecer (Heatherly e Elmore, 2004). O segundo mecanismo, o “evitamento”, envolve a estratégia de conservação do status

hídrico durante períodos de estresse, seja pela maior eficiência na absorção de água através das raízes ou pela redução da evapotranspiração das partes aéreas. Desta forma, as plantas evitam a seca aumentando o teor relativo de água, utilizando menos água disponível, mantendo baixa condutância na epiderme e ainda diminuindo as trocas gasosas. O terceiro mecanismo de defesa consiste na capacidade vegetal em tolerar a seca, o que permite à planta manter seu turgor e continuar seu metabolismo mesmo sob baixo potencial hídrico, por tolerância protoplasmática ou síntese de osmoprotetores ou solúveis compatíveis (Nguyen et al., 1997).

3.2.2.Mecanismos moleculares

As plantas respondem e se adaptam aos estresses ambientais não apenas em níveis fisiológico e morfológico, mas também em níveis celular e molecular, como pelo acúmulo de osmólitos e proteínas especificamente envolvidas na tolerância ao estresse (Shinozaki et al., 2003; Bartels e Sunkar, 2005; Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2005; Umezawa et al., 2006). Entretanto, as respostas das plantas à seca são complexas, envolvendo a expressão de genes que implicam na coordenação e na integração de múltiplas vias bioquímicas que contribuem para a aclimação das plantas à condição de seca (Barrero et al., 2006).

A percepção de estresses abióticos e a transdução de sinais são passos importantes na determinação da sobrevivência e na reprodução de plantas expostas a diferentes ambientes (Chinnusamy et al., 2004). A hipótese mais aceita para o início da sinalização em nível molecular propõe que alterações na conformação das membranas celulares devido à perda de turgescência provocariam mudanças em canais de transporte ativados por pressão, modificações na conformação ou na justaposição de proteínas sensoriais críticas embebidas nas membranas celulares e/ou também alterações na continuidade entre a parede e a membrana celulares. Todas essas alterações ativariam complexos enzimáticos que iniciariam uma cascata de eventos moleculares levando à indução da expressão de várias categorias de genes de resposta à perda de água (Nepomuceno et al., 2001; Xiong et al., 2002; Chinnusamy et al., 2004; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Após o mecanismo de percepção, sinais auxiliares como hormônios ou mensageiros secundários podem iniciar a cascata de eventos de sinalização. Muitos genes que codificam para fatores de transcrição estão envolvidos na cascata de transdução de sinal e são *up*-regulados por desidratação e frio como as MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases* – proteínas quinases ativadas por mitogênese), as CDPK (*Calcium-Dependent Protein Kinases* – proteínas quinases cálcio dependentes), as enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolipídios como a fosfolipase C e a PIP5 (4- fosfaditil, 5- fosfato, 5- quinase), canais de influxo de cálcio e SOS quinases (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1999; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Xiong et al, 2002; Zhang et al, 2004).

Uma resposta precoce ao estresse causado por seca, salinidade e baixas temperaturas é o aumento de cálcio (Ca^{2+}) citosólico derivado do influxo do espaço apoplástico ou da liberação de estoques internos (Kinight, 2002). Estas mudanças no nível de cálcio citosólico podem levar à ativação de vários genes de resposta à seca (Kim et al., 2004).

Algumas plantas sob déficit hídrico podem ainda acumular solutos compatíveis ou osmólitos no citoplasma para diminuir o potencial osmótico e, conseqüentemente, manter o potencial hídrico e o turgor das células próximo ao nível ótimo (Nepomuceno et al., 2001). O ajuste osmótico permite a manutenção de processos que dependem do turgor celular, tais como expansão e crescimento celular, abertura dos estômatos e fotossíntese, além de manter um gradiente de potencial hídrico favorável à absorção de água pelas raízes. Os solutos que participam do ajuste osmótico são inorgânicos, principalmente K^+ e Cl^- , ou compostos orgânicos, os chamados solutos compatíveis como prolina ou glicina-betaína e carboidratos como sacarose, trealose, pinitol, sorbitol ou manitol. Além do ajuste osmótico, estes solutos também promovem a desintoxicação de ROS, estabilizando as estruturas quaternárias das proteínas (Ruiz-Lozano, 2003; Chinnusamy et al., 2005) durante eventos de desidratação.

3.2.2.1. Genes envolvidos na resposta das plantas a estresses abióticos

As pesquisas visando a obtenção de plantas com maior tolerância a estresses abióticos iniciaram-se pela modificação de plantas com genes de “ação única”, ou seja, responsáveis pela modificação de um único metabólito. Proteínas induzidas por estresse com funções conhecidas eram os alvos principais na obtenção de tais transgênicos (Allen, 2010).

Contudo, tais estratégias negligenciaram o fato de que a tolerância ao estresse é uma característica multigênica. Desta forma, a “segunda geração” de transformações começou a inserir as chamadas proteínas regulatórias, em contraste com as proteínas funcionais da primeira geração de OGMs (Organismos Geneticamente Modificados) (Bhatnagar-Mathur et al., 2008). Por meio destas proteínas regulatórias, muitos genes envolvidos na resposta ao estresse podem ser simultaneamente regulados por um único gene que codifica para fatores de transcrição induzidos por estresse (Kasuga et al., 1999). Estes fatores de transcrição ativam uma cascata de genes que atuam em conjunto aumentando a tolerância frente a múltiplos estresses. Muitos destes estão envolvidos na resposta das plantas ao déficit hídrico, como as famílias de fatores de transcrição AP2/ERF (*APETALA2/Ethylene Response Factor*), bZIP (*Basic leucine Zipper domain*), NAC (*NAM, ATAF1, 2, e CUC2*), MYB (*myeloblastosis oncogene*), MYC (*myelocytomatosis oncogene*), Cis2His2 ZF (*Cistein2Histidin2Zinc-Finger*) e WRKY (*amino acids W, R, K, Y*) (Bhatnagar-Mathur et al., 2008).

Estresses abióticos podem causar a disfunção de muitos RNAs e proteínas. Em consequência, os genes induzidos por estresses codificam proteínas para proteger a conformação de outras proteínas, RNAs ou estruturas celulares. Os genes de ação única codificam para proteínas funcionais que atuam no metabolismo celular, provavelmente na tolerância ao estresse. Dentre as proteínas codificadas destacam-se as chaperonas, as LEA (*late embryogenesis abundant* – abundante na embriogênese tardia), osmotinas, proteínas anticongelantes e proteínas de ligação ao mRNA, bem como enzimas chaves na biossíntese de osmólitos, proteínas de canais de água,

transportadores de açúcar e prolina, além de enzimas de desintoxicação e várias proteases (Bhatnagar-Mathur et al., 2007; Allen, 2010).

As chaperonas moleculares são proteínas que, em condições de déficit hídrico contribuem para a homeostase celular uma vez que atuam auxiliando no dobramento de cadeias polipeptídicas recém-formadas, no redobramento de proteínas desnaturadas e na prevenção da agregação de partes protéicas, cujas superfícies hidrofóbicas estão expostas, prejudicando o dobramento. Muitas chaperonas estão envolvidas em respostas a estresses e muitas delas foram originalmente identificadas como proteínas de choque térmico (HSPs - *Heat-Shock Proteins*) (Cooper, 2002). As principais famílias de HSPs/chaperonas reconhecidamente conservadas são HSP70, chaperoninas, HSP90, HSP100 e sHSP (*small HSP*). As diferentes classes de HSPs/chaperonas cooperam na proteção celular e apresentam complementaridade e, algumas vezes, sobreposição de funções na proteção de proteínas contra estresses (Wang et al., 2004).

As proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA) são acumuladas em sementes durante a fase de maturação, quando é requerida a tolerância à dessecação (Close, 1996). Diversos estudos têm demonstrado que as proteínas LEA também se acumulam em tecidos vegetativos durante períodos de déficit hídrico, o que reforça a função destas proteínas na proteção contra a dessecação (Porcel et al., 2005, Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2005; Yoshida et al. 2010). Tais proteínas são hidrofílicas, apresentando alto conteúdo de glicina (Wise et al., 2004) e, durante a desidratação celular, atuam na manutenção da estrutura de outras proteínas, vesículas e endomembranas, bem como no sequestro de íons como o cálcio, na retenção de água e também atuam como chaperonas moleculares (Close, 1996).

Além das proteínas, os osmoprotetores também são acumulados durante o ajuste osmótico em períodos de déficit hídrico. Estes estão envolvidos na proteção de componentes celulares pela sua atividade tipo chaperona e por atuarem na eliminação das ROS (Hare et al., 1998; Diamant et al., 2001). Aminoácidos (prolina), outros grupos amino (glicina-betaína e poliaminas) e uma variedade de açúcares e açúcares-álcoois (manitol, trealose, galactinol, sorbitol) estão entre algumas das moléculas osmoprotetoras. Modificações nas vias de síntese destas moléculas podem conferir tolerância

ao estresse. Contudo, efeitos pleiotrópicos como necrose e diminuição do crescimento têm sido observados devido a alterações causadas nas vias endógenas do metabolismo primário, levando a poucos benefícios na produção de espécies GMs com esses transgenes (Serraj e Sinclair, 2002; Sinclair et al., 2004; Passioura, 2007).

Os genes que codificam para proteínas regulatórias estão envolvidos na regulação adicional da transdução de sinal em resposta ao estresse. Estes codificam para vários fatores de transcrição, proteínas quinases, fosfatases, enzimas envolvidas no metabolismo fosfolipídico e outras moléculas de sinalização como a proteína de ligação à calmodulina. Também estão neste grupo os genes envolvidos na biossíntese de ABA. Dos fatores de transcrição codificados, são identificados o DREB (*dehydration responsive element binding protein* – proteína de ligação ao elemento responsivo à desidratação), AREB (*ABA-responsive element binding protein* – proteína de ligação ao elemento responsivo ao ABA), MYC (*Myelocytomatosis oncogene*), MYB (*Myeloblastosis oncogene*), NAC (NAM, ATAF 1,2 e CUC), entre outros (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

A maioria dos genes estudados induzidos por seca são também induzidos por ABA, importante hormônio vegetal responsável por desempenhar papel crucial em uma variedade de processos do desenvolvimento vegetal e em resposta a estresses em plantas. No entanto, vários trabalhos têm descrito genes que são induzidos por desidratação, mas que não são induzidos por ABA, sugerindo a existência de duas cascatas de transdução de sinal, uma independente e outra dependente de ABA (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Zhang et al. 2006; Boneh et al. 2012). Duas famílias de fatores de transcrição estão envolvidas na sinalização e ativação gênica dependente de ABA: bZIP e MYB. Muitos genes induzidos por ABA apresentam um elemento *cis*-atuante (C/T ACGTGGC) na região promotora denominado ABRE (*ABA responsive element* – elemento responsivo ao ABA) (Mundy et al., 1990). A expressão constitutiva dos fatores de transcrição ABF3 e ABF4, que reconhecem os elementos ABRE na região promotora de determinados genes, aumentou a tolerância à seca em plantas de *Arabidopsis thaliana*, com expressão alterada de genes de resposta ao ABA como *RD29B*, *RAB18*, *ABI1* e *ABI2* (Kang et al., 2002).

3.2.2.2. Ácido abscísico e seu complexo de sinalização

O hormônio vegetal ácido abscísico (ABA) desempenha papel fundamental em uma ampla variedade de processos do desenvolvimento e em respostas das plantas aos estresses (Cutler et al., 2010; Fujita et al., 2011). A aclimação das plantas aos estresses ambientais está então associada ao aumento dos níveis de ABA (Boneh et al., 2012). Na fase germinativa e também na fase de crescimento vegetativo ocorre a indução para a síntese e acúmulo de ABA endógeno, que controla um grande número de genes envolvidos na desidratação e no crescimento. A expressão desses genes é regulada principalmente por duas famílias de proteínas bZIPs, ABI5 nas sementes e AREBs no estágio vegetativo (Fujita et al., 2011).

Um grande número de genes induzidos por ABA possui elementos conservados G-box *cis* atuantes, designados como ABREs (PyACGTGG/TC) (Zhang et al., 2005; Gomez-Porras et al., 2007; Maruyama et al., 2012). Análises de promotores revelaram que para uma completa ativação da expressão de genes de resposta a ABA são necessários múltiplos ABREs ou a combinação de ABRE com elementos complementares (CEs) como CE1, CE3, DRE/CRT (Narusaka et al., 2003).

As respostas das plantas ao déficit hídrico incluem murchamento, abscisão de vários órgãos, redução na área foliar e estímulo do crescimento radicular a fim de melhorar a eficiência do uso de água. O déficit hídrico desencadeia ainda a produção de ABA nas raízes e folhas, o que induz o fechamento estomático, reduzindo assim, a perda de água por transpiração, levando à diminuição da taxa fotossintética. Estas respostas melhoram a eficiência do uso de água pela planta a curto prazo. Assim, dada a importância do ABA na fisiologia das plantas nas respostas a estresses ambientais, o entendimento dos processos que compreendem desde a transdução de sinais do hormônio até os mecanismos de respostas desencadeados por ele são foco de muitas pesquisas básicas e avançadas, tanto para o ABA intra- como intercelular (Umezawa et al., 2010).

Recentemente, avanços em pesquisas com ABA têm elucidado a via de sinalização ABA-dependente. Diversos estudos bioquímicos, celulares e estruturais realizados em *Arabidopsis thaliana* demonstraram que a via de

sinalização de ABA consiste em três classes de proteínas: os receptores de ABA, as proteínas fosfatases tipo 2C (PP2Cs) e as quinases SnRK2 (Figura 1). Neste complexo as proteínas START PYR/PYL/RCAR (*Pyrabactin resistance 1 / Pyrabactin resistance 1-like / Regulatory Component of ABA Receptor – Pirabactina resistente 1 - 1*) funcionam como receptores solúveis de ABA (Ma et al., 2009; Park et al., 2009); e o complexo de proteínas fosfatase-quinase, PP2C – SnRK2 (proteínas fosfatases tipo 2C – SNF1 proteínas quinases relacionadas 2), apresenta-se como componente *downstream* de PYR/PYL/RCAR (Umezawa et al., 2009; Vlad et al., 2009).

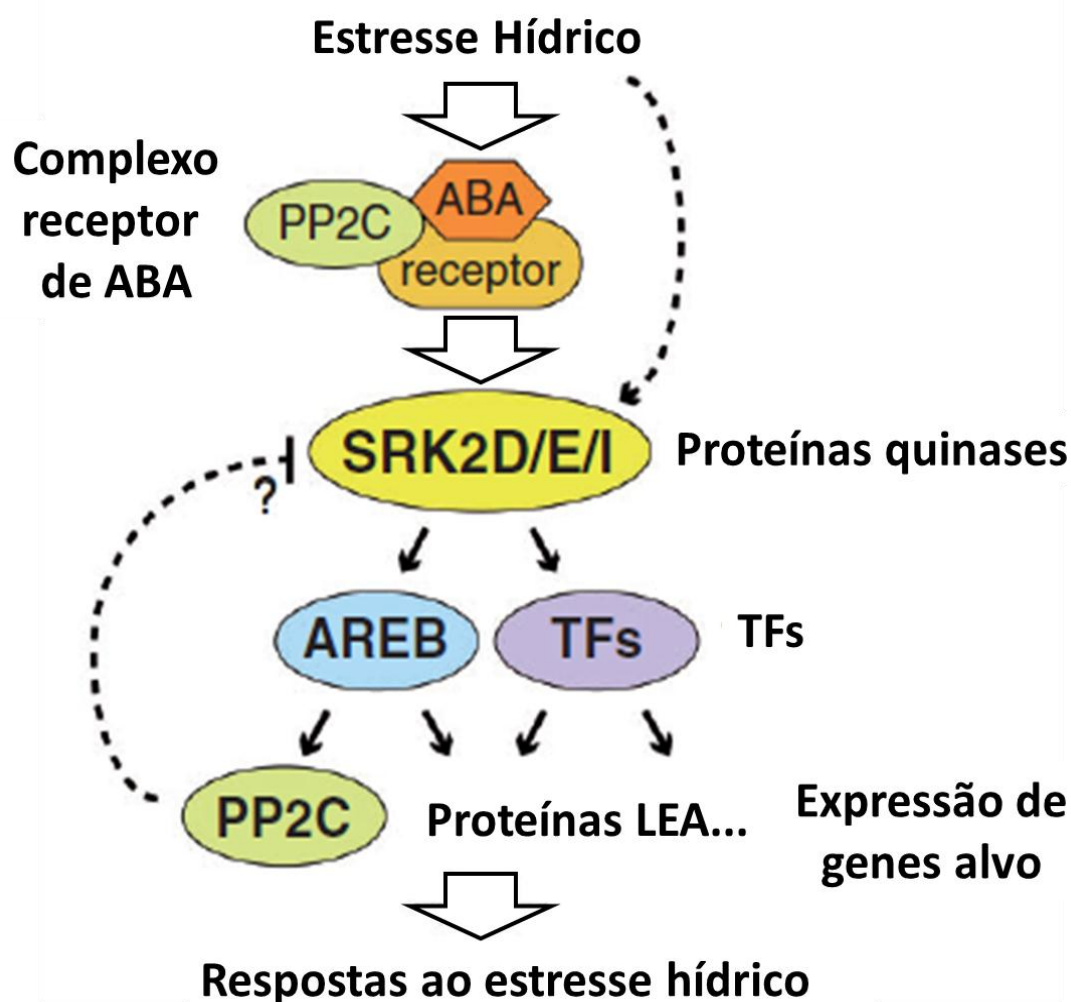


Fig. 1 Modelo para regulação de sinalização de ABA em resposta ao déficit hídrico. Em situações não estressadas, as PP2Cs se ligam as SRK2D/E/I (Park et al., 2009). Em resposta ao déficit hídrico, ABA é produzido para a ativação das SRK2D/E/I via complexo receptor de ABA PP2C-PYR/PYL/RCAR (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Com a regulação positiva das SRK2D/E/I os genes *downstream* são ativados. Dentre eles os fatores de transcrição (TFs), PP2Cs do tipo HAI1, e LEAs. Conseqüentemente, as PP2Cs se ligam as SRK2D/E/I para afinar a sinalização de ABA em resposta ao déficit hídrico. Adaptado de Fujita et al. (2009).

A via de transdução de sinal do ABA consiste em um sistema de regulação duplo-negativo (Boneh et al., 2012) onde as proteínas START (PYR/PYL/RCAR) se ligam ao ABA e inibem a atividade das fosfatases PP2C, e as PP2Cs inativam as SnRK2s (Park et al., 2009; Umezawa et al., 2009; Vlad et al., 2009). Neste modelo, na ausência de ABA as proteínas SnRK2s são mantidas inativas pelas PP2Cs através de interação física e desfosforilação. Na presença de ABA o complexo ABA-PYR/PYL/RCARs interage com as PP2Cs, resultando na interrupção da interação entre PP2Cs e SnRK2s, liberando assim as SnRK2s de sua inibição. Na ausência da atividade da fosfatase PP2C, os SnRK2s ficam livres para ser ativados por autofosforilação e, como resultado ativam os genes alvos *downstream*, que incluem fatores de transcrição, assim como genes alvos (Boneh et al., 2012). Muitos alvos de SnRK2 foram identificados tanto na membrana plasmática quanto no interior do núcleo (Figura 2A), resultando no controle de canais de íons, produção de mensageiros secundários e expressão de genes ABA-responsivos (Raghavendra et al., 2010). Porém, não se sabe se sua autofosforilação é suficiente para ativá-la ou se ainda outros fatores *in vivo* são necessários (Cutler et al., 2010).

O complexo de sinalização do ABA (Figura 2) foi demonstrado em ensaios de expressão transiente em mesófilos de *Arabidopsis thaliana* por Fugii et al. (2009). No genoma de *Arabidopsis* existem 14 PYR/PYL/RCARs, 9 PP2Cs e 3 SnRKs essenciais, as quais podem realizar muitas combinações entre si, não contando ainda os fatores AREBs, que aumentam as possibilidades nas regulações transcricionais (Umezawa et al., 2010). Em modelos anteriores da sinalização do ABA, cada receptor ABA e/ou ligante proteico foram colocados aleatoriamente em diferentes localizações celulares em paralelo, e suas relações com a via de sinalização ABA foram complexas (McCourt e Creelman 2008).

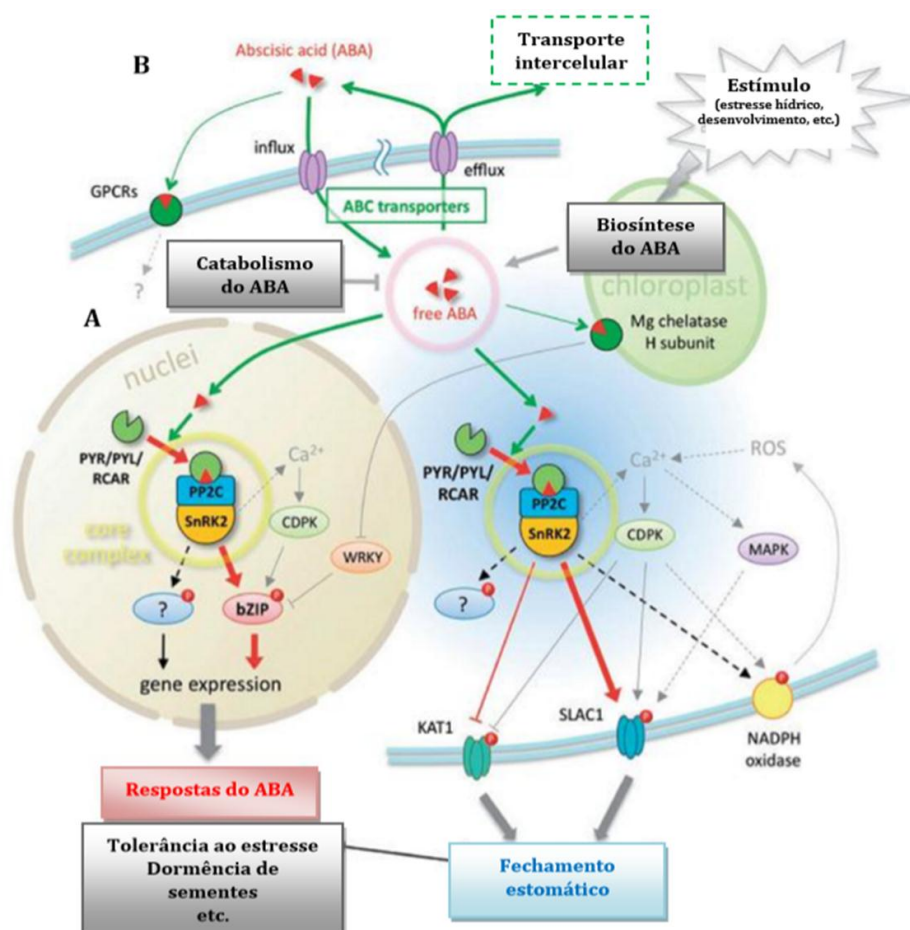


Fig. 2 Visão geral da sensibilidade, sinalização e transporte de ABA. **a)** PYR/PYL/RCAR-PP2C-SnRKs formam o complexo principal de sinalização (círculo amarelo). Na ativação no núcleo, o complexo regula diretamente a expressão gênica ABA-responsiva por fosforilação dos fatores de transcrição AREB/ABF. Na ativação no citoplasma, o complexo pode acessar a membrana plasmática e fosforilar canais de ânions (SLAC1) ou canais de potássio (KAT1) para induzir o fechamento estomático em resposta ao ABA. **b)** O sistema de transporte de ABA consiste em dois tipos de transportadores ABC, para influxo ou para efluxo. O movimento de ABA está indicado por linhas verdes e flechas, e as principais vias de sinalização estão indicadas por linhas vermelhas e flechas. Linhas pontilhadas indicam conexões indiretas ou não confirmadas. Adaptado e traduzido de Umezawa et al., (2010).

O grupo A PP2Cs são funcionalmente redundantes ao nível molecular, mas têm papéis distintos em diferentes tecidos e órgãos, como indicado pelos padrões de expressão específicos de tecidos. Por exemplo, a PP2C ABI1 é expressa em vários tecidos, incluindo sementes e células-guarda, mas AHG1 e AHG3/AtPP2CA são expressas predominantemente em sementes (Yoshida et al., 2006; Nishimura et al., 2007; Umezawa et al., 2009).

Cada PP2C ou SnRK2 possui seletivas interações proteína-proteína o que resulta em várias combinações de complexos de PP2C-SnRK2 que podem ser formados (Umezawa et al., 2009). Em geral, as interações proteína-proteína estão limitadas pela localização subcelular, que pode ser também

importante para a composição do complexo de sinalização de ABA. PYR/PYL/RCARs e SnRK2s estão localizadas no citosol ou no núcleo, mas há dois tipos de localização PP2C: ABI1 e ABI2 são encontrados no citoplasma e no núcleo, mas AHG1 e AHG3 são específicos para o núcleo. Portanto, isto sugere que a composição do complexo receptor deve ser diferente entre o citoplasma e núcleo. Outros fatores podem afetar a variação da sinalização ABA no núcleo, por exemplo, alguns PYR/PYL/RCARs são estéreo-seletivos para isômeros de ABA. Além disso, uma análise de levedura de dois híbridos também sugeriu que cada PYR/PYL/RCAR tem uma esterosseletividade diferente (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Neste sentido, dois receptores estreitamente relacionados, RCAR1 e RCAR3, têm diferentes seletividade e sensibilidade ao ABA (Szostkiewicz et al., 2010). Estas diferenças podem afetar a formação do complexo de sinalização e modulam o ajuste fino da sinalização do ABA. No entanto, essas variações estão limitadas pelas determinantes bioquímicas e espaço-temporal das moléculas (Umezawa et al., 2010).

Em *Arabidopsis* existem dez membros de SnRK2, designados de SRK2A-SRKJ (Yoshida et al., 2002) ou SnRK2.1-SnRK2.10 (Hrabak et al. 2003), classificados em 3 subclasses: I, II e III (Kobayashi et al 2004). A subclasse III da família SnRK2 é composta por três proteínas, nomeadas SRK2D (SnRK2.2), SRK2I (SnRK2.3) e SRK2E (OST1/SnRK2.6). O ABA é responsável por ativar cinco SnRK2s de *Arabidopsis*: SnRK2.8, SnRK2.2, SnRK2.6, SnRK2.7 e SnRK2.3 (Boudsocq et al., 2004). O fator de transcrição AREB1/ABF2 é fosforilado por todas estas cinco proteínas de SnRK2s (Furihata et al., 2006). Em oposição a SRK2C e SRK2F, as três proteínas quinases SRK2D/E/I encontram-se no mesmo clado da árvore filogenética da subfamília SnRKs e também são fortemente ativadas tanto por ABA quanto por estresse osmótico (Boudsocq et al., 2004). Portanto, como AREB1 também é ativado por ABA e estresse osmótico (Uno et al., 2000; Fujita et al., 2005; Furihata et al., 2006), as quinases SRK2D/E/I possuem todos os requisitos como reguladoras de AREB1 (Fujita et al., 2009).

As proteínas fosfatases são divididas de acordo com sua especificidade ao substrato em classes de Ser/Thr, Tyr e de dupla especificidade. Dependendo de suas características estruturais e bioquímicas, as fosfatases

Ser/Thr de plantas são ainda divididas nos grupos PP1, PP2A e PP2C (Ma et al., 2009). As PP2Cs do grupo A mais estudadas na sinalização do ABA são geralmente descritas como enzimas monoméricas Mg^{+2}/Mn^{+2} -dependente e a inibição de sua função é feita pela família de receptores PYR/PYL/RCAR, que conecta a percepção do ABA diretamente ao sistema de aprisionamento (*gate-latch-lock mechanism*) das PP2Cs (Ma et al., 2009; Melcher et al., 2009; Park et al., 2009; Santiago et al., 2009). Alguns dos principais alvos das fosfatases foram identificados e comprovou-se que o seu papel é a desfosforilação e inativação das SnRKs, agindo como um eixo que conecta a percepção do ABA com o controle de diferentes efetores envolvidos na tolerância ao estresse (Cutler et al., 2010).

Existem nove grupos de PP2C do grupo A em *Arabidopsis* (Schweighofer et al., 2004; Xue et al., 2008), das quais seis (ABI1, ABI2, AHG1, AHG3, HAB1 e HAB2) têm funções como reguladoras negativas da sinalização de ABA, principalmente durante a germinação (Hirayama e Shinozaki, 2007), e podem apresentar sobreposição de função.

3.2.2.3. Fatores de Transcrição AREB

Algumas classes de fatores de transcrição com domínios zíper de leucina básico (bZIP) estão entre os genes de regulação que desempenham papéis fundamentais na tolerância a estresses por salinidade, frio, calor e seca. cDNAs de *Arabidopsis* que codificam para fatores de transcrição da família bZIP referidos como AREB/ABF (ABA-Responsive Element Binding protein/ABRE-Binding Factor – proteína de ligação ao elemento ABA-reponsivo/ Fator de ligação ao ABRE) foram isolados em levedura pelo sistema de varredura duplo-híbrido (Choi et al., 2000; Uno et al., 2000). No genoma de *Arabidopsis* existem 75 fatores de transcrição bZIP divididos em 13 grupos (do grupo A ao L, e S) de acordo com seus domínios bZIP e similaridades entre os *motifs* conservados (Corrêa et al., 2008). Destes grupos, 13 proteínas são classificadas como pertencentes à subfamília de *AtAREBs/AtABFs* e apresentam três domínios conservados, sendo dois na região N-terminal e um na região C-terminal (Jakoby et al., 2002).

Corrêa et al. (2008) apresentaram uma classificação mais atualizada sobre a evolução dos fatores bZIPs de plantas. No entanto, a fim de facilitar o entendimento, utilizou-se nesta revisão a classificação de Jakoby et al. (2002) e, nesta abordagem, os dados sobre o grupo onde AREB1 está inserido em *Arabidopsis* são os mesmos quando comparados à outra classificação. O grupo A surge primeiramente em termos evolutivos no ancestral comum mais recente das espermatófitas e foi recrutado não só para o desenvolvimento das sementes ou germinação, mas também para o “ajuste-fino” das respostas à desidratação e ao estresse salino (Corrêa et al., 2008). Esta subfamília (Grupo A) dos fatores bZIPs é composta por nove homólogos no genoma de *Arabidopsis*, de modo que AREB1/ABF2, AREB2/ABF4, ABF3 são expressos principalmente em resposta à desidratação e à alta salinidade em tecidos vegetativos, mas não em sementes, mostrando que membros de um mesmo grupo podem ter padrões de expressão similares e compartilhar funções (Fujita et al., 2005). Neste mesmo estudo, plantas de *Arabidopsis* transgênicas superexpressando uma forma ativa do gene *AREB1* (*AREB1ΔQT*) mostraram hipersensibilidade ao ABA e maior tolerância a seca, ao passo que AREB1, AREB2 e AREB3 sem modificação na proteína requereram aumento da síntese do ABA para sua completa ativação. Em adição, oito genes representando dois grupos de proteínas funcionais e regulatórias foram *up*-regulados: genes da classe LEA e genes regulatórios estresse- e ABA-induzidos.

Quando a planta acumula ABA em suas células devido à alguma forma de estresse ambiental, a expressão de muitos genes ABA-responsivos é induzida (Seki et al., 2002). No entanto, para que ocorra a transcrição dos genes ABA-dependentes, uma única cópia de ABRE não é o suficiente. Ao contrário, muitos elementos *cis* ABRE, com a sequência conservada PyACGTGG/TC, ou a combinação de um elemento ABRE com um elemento complementar (*Coupling Element* – CE1, CE3), constituem o complexo ABA-responsivo (Zhang et al., 2005; Gomez-Porras et al., 2007). Os CE são muito similares ao ABRE, sendo que em *Arabidopsis* a sequência DRE/CRT pode servir como um CE de ABRE em resposta ao ABA (Narusaka et al., 2003), sugerindo a existência da interação entre os *regulons* de DREB (Dehydration responsive element binding – elemento de ligação responsivo a desidratação) e *regulons* relativos ao ABRE.

Na sinalização e ativação gênica dependente de ABA, o *regulon* AREB/ABF é constituído de uma cascata gênica, onde a região promotora dos genes que a constituem possuem o maior *cis*-elemento da expressão gênica ABA-dependente, o ABRE. Alguns trabalhos têm demonstrado o uso e a eficiência destes fatores de transcrição AREB na obtenção de OGMs mais tolerantes à seca (Fujita et al., 2005; Barbosa et al., 2012; Li et al., 2013). Assim, a expressão constitutiva dos fatores de transcrição *ABF3* e *ABF4*, que reconhecem os elementos ABRE na região promotora de determinados genes, aumentou a tolerância à seca em plantas transgênicas de *A. thaliana*, exibindo ainda expressão aumentada de genes de resposta ao ABA, como *rd29B*, *rab18*, *ABI1* e *ABI2* (Kagaya et al., 2002; Kang et al., 2002).

A ativação transcricional de AREB depende de uma modificação pós-transcricional (fosforilação). Este complexo mecanismo envolve a presença de uma recém-descoberta classe de *START proteins* [(PYR / PYR-like (PYL) / *Regulatory Component of ABA Receptors* (RCAR))] (Fujii et al., 2009; Nishimura et al., 2009; Myazono et al., 2009; Melcher et al., 2009; Santiago et al., 2009; Yin et al., 2009), previamente identificadas como *ABA receptors*, onde na presença de ABA tais proteínas “aprimam-o” e depois sequestram uma fosfatase (PP2C), permitindo com que outras proteínas quinases fosforilem e ativem fatores *trans* AREBs/ABFs (Sheard e Zheng, 2009). Uno et al. (2000) observaram que a quinase ABA-responsiva de 42-kD fosforila regiões conservadas de AREBs/ABFs, sugerindo que a fosforilação ABA-dependente poderia estar envolvida na ativação da subfamília de proteínas AREB. De fato, a ativação de AREB1 requer modificação pós-transcricional ABA-dependente. A atividade da quinase ABA-dependente 42-kD fosforila resíduos Ser/Thr do sítio R-X-X-S/T em regiões conservadas de AREB1 (Furiihata et al., 2006). Plantas transgênicas superexpressando a forma ativa fosforilada de AREB1 expressaram muitos genes ABA-induzidos, incluindo *RD29B*, sem tratamento com ABA (Furiihata et al., 2006). Estes resultados sugerem que a fosforilação multi-sítio ABA-dependente de AREB1 regula sua própria ativação em plantas, e que eventos regulados de fosforilação e desfosforilação são importantes para a sinalização do ABA (Nakashima et al., 2009).

Yoshida et al. (2010) avaliaram três membros da família AREB, os genes *AREB1*, *AREB2* e *AREB3*, e reportaram que estes fatores de transcrição

requerem ABA para sua completa ativação, além de poderem formar hetero- ou homodímeros para atuarem no núcleo, bem como interagirem com a proteína SRK2D/SnRK2.2, uma SnRK2 quinase identificada como reguladora de AREB1. Estes autores sugeriram também que estes três fatores têm funções que se sobrepõem e, para identificar seu papel, produziram triplos mutantes de *AREB1*, *AREB2* e *ABF3*. Com análises em larga escala de transcriptoma, foram identificados alguns genes significativamente *down*-regulados nos mutantes triplos em resposta à desidratação, alta salinidade e tratamento com ABA, incluindo genes da classe das proteínas LEA como *RD29B*, *AIL1*, *RAB18*, *EM1* e *EM6*; genes ABA-regulados como *RD20*, *ITP4* e *SAG29*; genes de fatores de transcrição myb como *AtMYB74*, *AtMYB79*, *AtMYB102* e *AtMYB121*; e genes da fosfatase grupo-A tipo 2 (*group-A type-2C protein phosphatase - pp2c*) como *AHG1*, *AHG3*, *HAI1*, *HAI2* e *HAI3*.

Os referidos autores analisaram ainda o crescimento dos mutantes triplos, duplos e simples para os três genes e observaram diminuição no crescimento quando os mutantes foram cultivados em substrato. Porém, não foram observadas diferenças marcantes quando crescidos em ágar. Estes dados corroboraram outros estudos os quais relataram que *AREB1*, *AREB2* e *ABF3* são reguladores positivos da via de sinalização do ABA, sugerindo que a inibição no crescimento das plantas em substrato poderia ser resultado de um aumento na sensibilidade à seca (Kang et al., 2002; Kim et al., 2004; Fujita et al., 2005). Para testar esta hipótese, os pesquisadores observaram a recuperação das plantas após reidratação em substrato e identificaram que a taxa de sobrevivência dos triplos mutantes *areb1 areb2 abf3* foi marcadamente reduzida quando comparada às taxas dos mutantes simples, duplos e plantas não-transformadas, sugerindo que todos os três fatores de transcrição *AREB1*, *AREB2* e *ABF3* possuem sobreposição de função pois todos conferem tolerância à seca (Yoshida et al., 2010).

Neste contexto, a introdução de construções gênicas contendo o gene *AtAREB1* isolado de *A. thaliana* juntamente com o promotor constitutivo 35S em embriões de soja apresenta-se como mais uma alternativa na busca de linhagens mais tolerantes a períodos de déficit hídrico (Ohtsu et al., 2007).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, R. D. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v.65, p.127-160, 2010.

BAHRUN, A.; JENSEN, C.R.; ASCH, F.; MOGENSEN, V. Drought-induced changes in xylem pH, ionic composition, and ABA concentration act as early signals in field-grown maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.53, p. 251-263, 2002.

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.L. Overexpression of the ABA-Dependent AREB1 Transcription Factor from *Arabidopsis thaliana* Improves Soybean Tolerance to Water Deficit. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.31, p.719–730, 2012.

BARRERO, J. M.; RODRÍGUEZ, P. L.; QUESADA, V.; PIQUERAS, P.; PONCE, M. R.; MICOL, J. L. Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of NCED3, AAO3 and ABA1 in response to salt stress. **Plant, Cell and Environmental**, v.28, p.2000-2008, 2006.

BARTELS, D.; SUNKAR R. Drought and Salt Tolerance in Plants. **Plant Sciences**, V.24, 23–58, 2005.

BHATNAGAR-MATHUR, P.; DEVI, M.J.; REDDY, D.S.; LAVANYA, M.; VADEZ, V.; SERRAJ, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHARMA, K.K. Stress-inducible expression of AtDREB1A in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) increases transpiration efficiency under water-limiting conditions. **Plant Cell Reports**. v.26, p. 2071-2082, 2007.

BHASKARA, G.B.; NGUYEN, T.T.; VERSLUES, P.E. Unique Drought Resistance Functions of the Highly ABA-Induced Clade A Protein Phosphatase 2Cs^{[WJ]^{OA]}. **Plant Physiology**. v. 160, p.379–395, 2012.}

BHATNAGAR-MATHUR, P.; VADEZ, V.; SHARMA, K. K. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. **Plant Cell Reporter**, v.27, p.411–424, 2008.

BONATO, E. R. Estresses em soja. Passo Fundo: **Embrapa Trigo**, 254 p. 2000.

BONEH, U.; BITON, I.; SCHWARTZ, A.; BEM-ARI, G. Characterization of the ABA signal transduction pathway in *Vitis vinifera*. **Plant Science**, v.187, p.89-96, 2012.

BOUDSOCQ, M.; BARBIER-BRYGOO, H.; LAURIERE, C. Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.41758–41766, 2004.

BURKE, E. J.; BROWN, S. J.; CHRISTIDIS, N. Modeling the recent evolution of global drought and projections for the twenty-first century with the Hadley centre climate model. **Journal Hydrometeorology**, v.7, p.1113-1125, 2006.

CHINNUSAMY, V.; SCHUMAKER, K.; ZHU, J-K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.395, p.225-236, 2004.

CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU, J. K. Understanding and improving salt tolerance in plants. **Crop Science**, v.45, p.437–448, 2005.

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.

CI SOJA – **Centro de Inteligência da Soja**. Disponível em: <<http://www.cisoja.com.br>> com acesso em agosto de 2010.

CLOSE, T. J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.291-296, 1996.

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

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível no site <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em setembro de 2013.

COOPER, G. M. **A célula: uma abordagem molecular**. 2a Ed., São Paulo, ArtMed Editora, 2002.

CORRÊA, L. G.; RIANO-PACHON, D.M.; SCHRAGO, C. G.; DOS SANTOS, R. V.; MUELLER-ROEBER, B.; VINCENTZ, M. The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. **PLOS One**, v.3, n.8, 2008.

CUTLER, S. R.; RODRIGUEZ, P. L.; FINKELSTEIN, R. R.; ADAMS, R. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. **Annual Review Plant Biology**, v.61, p. 651-679, 2010.

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

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

EMBRAPA – **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br>.> acesso em: 2005.

EMBRAPA – **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=25&cod_pai=29> acesso em: 16 de agosto de 2011.

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.

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*. **Plant Molecular Biology**, v. 17, p.3470-3488, 2005.

FUJITA, Y.; NAKASHIMA, K.; YOSHIDA, T.; KATAGIRI, T.; KIDOKORO, S.; KANAMORI, N.; UMEZAWA, T.; FUJITA, M.; MARUYAMA, K.; ISHIYAMA, K.; KOBAYASHI, M.; NAKASONE, S.; YAMADA K.; ITO, T.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. **Plant Cell Physiology**, v.50, p.2123-2132, 2009.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of Plant Research**, v.124, p.509–525, 2011.

FUJII, H.; CHINNUSAMY, V., RODRIGUES, A.; RUBIO, S.; ANTONI, R.; PARK, S.-Y.; CUTLER, S. R.; SHEEN, J.; RODRIGUEZ, P. L.; ZHU, J.-K. *In vitro* reconstitution of an abscisic acid signaling pathway. **Nature**, v.462, p.660–664, 2009.

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

GAO, S.; CHEN, M.; XU, Z.; ZHAO, C.; LI, L.; XU, H.; TANG, Y.; ZHAO, X.; MA, Y. The soybean GmbZIP1 transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, v.75, p.537–553, 2011.

GOMEZ-PORRAS, J.; RIAN, O.; PACHO, N. D.; DREYER, I.; MAYER, J.; MUELLER-ROEBER, B. Genome-wide analysis of ABA-responsive elements

ABRE and CE3 reveals divergent patterns in *Arabidopsis* and rice. **BMC Genomics**, v.8, p.260, 2007.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant Cell Environ**, v.21, p.535-553, 1998.

HEATHERLY, L. G. & ELMORE, T. W. Managing inputs for peak production. In **Soybeans: Improvement, Production and Uses**. Edited by Specht, J. E. e Boerma, H. R. p.451-536. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, 2004.

HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. **Trends of Plant Science**, v.12, p.343–351, 2007.

HRABAK, E.M.; CHAN, C.W.M.; GRIBSKOV, M.; HARPER, J.F.; CHOI, J.H.; HALFORD, N.; KUDLA, J.; LUAN, S.; NIMMO, H.G.; SUSSMAN, M.R.; THOMAS, M.; WALKER-SIMMONS, K.; ZHU, J.; HARMON, A.C. The *Arabidopsis* CDPK-SnRK Superfamily of Protein Kinases. **Plant Physiology**, v. 132, p.666-680, 2003.

ISODA, A.; WANG, P. Leaf temperature and transpiration of field-grown cotton and soybean under arid and humid conditions. **Plant Prod. Sci.**, v.5, p.224-228, 2002.

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

JAVOT, H.; MAUREL, C. The role of aquaporins in root water uptake. **Annals of Botany**, v.90, p.301-313, 2002.

KAGAYA, Y.; HOB0, T.; MURATA, M.; BAN, A.; HATTORI, T. Abscisic acid induced transcription is mediated by phosphorylation of an abscisic acid response element binding factor, TRAB1. **Plant Cell**, v.14, p.3177–3189, 2002.

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. **Nat Biotechnol**, v.17, p.287–291, 1999.

KIM, Y. J.; KIM, J. E.; LEE, J-H.; LEE, M. H.; JUNG, H. W.; BAHK, Y. Y.; HWANG, B. K.; HWANG, I.; KIM, W. T. The *Vr-PLC3* gene encodes a putative plasma membrane-localized phosphoinositide-specific phospholipase C whose

expression is induced by abiotic stress in mung bean (*Vigna radiate* L.). **FEBS Letters**, v.556, p.127-136, 2004.

KIM, T.H.; HAUSER, F.; HA, T.; XUE, S.; BÖHMER, M.; NISHIMURA, N.; MUNEMASA, S.; HUBBARD, K.; PEINE, N.; LEE, B.H.; LEE, S.; ROBERT, N.; PARKER, J.E.; SCHROEDER, J.I. Chemical genetics reveals negative regulation of abscisic acid signaling by a plant immune response pathway. **Current Biology**, v.21, p.990–997, 2011.

KINIGHT, H. Calcium signaling during abiotic stress in plants. **Int. Rev Cytol.**, v.195, p.269-325, 2002.

KLAMKOWSKI, K.; TREDER, W. Morphological and Physiological Responses of Strawberry Plants to Water Stress. **Agriculture Conspectus Scientificus**, v.71, n.4, p. 159-165, 2006.

LAZZAROTTO, J.J.; REIS, B.S. Beneficiamento de sementes de soja no Mato Grosso: análise de viabilidade financeira e de riscos associados. **Revista de Estudos Sociais**, v.11, n°21, 2009.

LI, X.; LIU, X.; YAO, Y.; LI, Y.; LIU, S.; HE, C.; LI, J.; LIN, Y.; LI, L. Overexpression of *Arachis hypogaea* AREB1 Gene Enhances Drought Tolerance by Modulating ROS Scavenging and Maintaining Endogenous ABA Content. **International Journal of Molecular Sciences**. v.14, p.12827-12842, 2013.

LIU, Y.; ZHOU, J.; OMELCHENKO, M.V.; BELIAEV, A.S.; VENKATESWARAN, A.; STAIR, J.; WU, L.; THOMPSON, D.K.; XU, D.; ROGOZIN, I.B.; GAIDAMAKOVA, E.K.; ZHAI, M.; MAKAROVA, K.S.; KOONIN, E.V.; DALY, M.J. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.4191–4196, 2003.

LIU, F.; JENSEN, C. R.; ANDERSEN, M. N. A review of drought adaptation in crop plants: changes in vegetative and reproductive physiology induced by ABA-based chemical signals. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.56, p.1245-1252, 2005.

MA, Y.; SZOSTKIEWICZ, I.; KORTE, A.; MOES, D.; YANG, Y.; CHRISTMANN, A.; GRILL, E. Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. **Science**. v.324, p.1064-1068, 2009.

MARUYAMA, K.; TODAKA, D.; MIZOI, J.; YOSHIDA, T.; KIDOKORO, S.; MATSUKURA, S.; TAKASAKI, 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*, Rice, and Soybean. **DNA Research**, v.19, p.37–49, 2012.

MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A.M.; CROSATTI, C.; GUERRA, D.; STANCA, A.M.; CATTIVELLI, L. Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. **Plant Science**, v.174, p.420-431, 2008.

MCCOURT, P.; CREELMAN, R. The ABA receptors - we report you decide. **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, p.474-478, 2008.

MELCHER, K.; NG, L. M.; ZHOU, X. E.; SOON, F. F.; XU, Y.; SUINO-POWELL, K. M.; PARK, S. Y.; WEINER, J. J.; FUJII, H.; CHINNUSAMY, V.; KOVACH, A.; LI, J.; WANG, Y.; LI, J.; PETERSON, F. C.; JENSEN, D. R.; YONG, E. L.; VOLKMAN, B. F.; CUTLER, S. R.; ZHU, J. K.; XU, H. E. A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. **Nature**, v.462, p.602-608, 2009.

MIYAZONO, K.; MIYAKAWA, T.; SAWANO, Y.; KUBOTA, K.; KANG, H. J.; ASANO, A.; MIYAUCHI, Y.; TAKAHASHI, M.; ZHI, Y.; FUJITA, Y.; YOSHIDA, T.; KODAIRA, K. S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; TANOKURA, M. Structural basis of abscisic acid signalling. **Nature**, v.462, p.609-614, 2009.

MUNDY, J.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CHUA, N. H. Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice rab gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 87:406-410, 1990.

NAKASHIMA, K.; ITO, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. **Plant Physiology**, v.149, n.1, p.88-95, 2009.

NARUSAKA, Y.; NAKASHIMA, K.; SHINWARI, Z. K.; SAKUMA, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; NARUSAKA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUSCHI-SHINOZAKI, K. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. **The Plant Journal**, v.34, p. 137-148, 2003.

NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.23, p.12-18, 2001.

NGUYEN, H. T.; BABU, R. C.; BLUM, A. Breeding for drought resistance in rice: physiology and molecular genetics considerations. **Crop Science**, v.37, p. 1426-1434, 1997.

NISHIMURA, N.; YOSHIDA, T.; KITAHATA, N.; ASAMI, T.; SHINOZAKI, K.; HIRAYAMA, T. ABA-Hypersensitive Germination encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seed. **Plant Journal**, v.50, p.935-949, 2007.

NISHIMURA, N.; HITOMI, K.; ARVAI, A. S.; RAMBO, R. P.; HITOMI, C.; CUTLER, S. R.; SCHROEDER, J. I.; GETZOFF, E. D. Structural mechanism of

abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. **Science**, v.326, p.1373-1379, 2009.

OHTSU, K.; SMITH, M.B.; EMRICH, E.J.; BORSUK, L. A.; ZHOU, R.; CHEN, T.; ZHANG, X.; TIMMERMANS, M. C. P.; BECK, J.; BUCKNER, B.; JANICK-BUCKNER, D.; NETTLETON, D.; SCANLON, M.J.; SCHNABLE, S. Global gene expression analysis of the shoot apical meristem of maize (*Zea mays* L.). **Plant Journal**; 52(3): 391–404, 2007.

OSOSKI, A. L.; KENNELLY, E. J. Phytoestrogens: a review of the present state of research. **Phytotherapy Research**, v.17, p. 84-86, 2003.

PARK, S.Y.; FUNG, P.; NISHIMURA, N.; JENSEN, D.R.; FUJII, H.; ZHAO, Y.; LUMBA, S.; SANTIAGO, J.; RODRIGUES, A.; CHOW, T.F.; ALFRED, S.E.; BONETTA, D.; FINKELSTEIN, R.; PROVART, N.J.; DESVEAUX, D.; RODRIGUEZ, P.L.; MCCOURT, P.; ZHU, J.; SCHROEDER, J.I.; VOLKMAN, B.F.; CUTLER, S.R. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. **Science**, v.324, p.1068–1071, 2009.

PASSIOURA, J. The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. **Journal Experimental Botany**, v.58, p.113-117, 2007.

PORCEL, R.; AZCO'N, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Evaluation of the role of genes encoding for dehydrin proteins (LEA D-11) during drought stress in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants. **Journal of Experimental Botany**, v.417, p.1933–1942, 2005.

RAGHAVENDRA, A.S.; GONUGUNTA, V.K.; CHRISTMANN, A.; Grill, E. ABA perception and signalling. **Trends in Plant Sciences**, v.15, p.395–401, 2010.

REEVES, W.M.; LYNCH, T.J.; MOBIN, R.; FINKELSTEIN, R.R. Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive (ABI) 4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors. **Plant Molecular Biology**, 75:347–363, 2011.

RUIZ-LOZANO, J. M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. **Mycorrhiza**.v.13, p.309-317, 2003.

SAKAI, T.; KOGISO, M. Soy isoflavones and immunity. **Journal of Medical Investigation**, v. 55, p. 167-173, 2008.

SANTIAGO, J.;DUPEUX, F.; ROUND, A.; ANTONI, R.; PARK, S. Y.; JAMIN, M.; CUTLER, S. R.; RODRIGUEZ, P. L.; MÁRQUEZ, J. A. The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. **Nature**, v.462, p.665-668, 2009.

SCHWEIGHOFER, A.; HIRT, H.; MESKIENE, I. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. **Trends in Plant Science**, v.9, p.236–243, 2004.

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. **Plant Cell**, v.13, p.61-72, 2002.

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

SHARMA, K.K.; LAVANYA, M. Recent developments in transgenics for abiotic stress in legumes of the semi-arid tropics. **JIRCAS Working Report**, p.61-73, 2002.

SHARP, R. E. Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.211–222, 2002.

SHEARD, L. B.; ZHENG, N. Signal advance for abscisic acid. **Nature**, v.462, p.575-576, 2009.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Biotechnology Intelligence Unit – Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants. In: **Molecular Response to Drought Stress**. p.11-25, 1999.

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 in 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.

SINCLAIR, B. J.; JACO KLOK, C.; CHOWN, S. L. Metabolism of the sub-Antarctic caterpillar *Pringleo phagamarioni* during cooling, freezing and thawing. **Journal Experimental Biology**, v.207, p.1287-1294, 2004.

SZOSTKIEWICZ, I.; RICHTER, K.; KEPKA, M.; DEMMEL, S.; MA, Y.; KORTE, A.; ASSAAD, F.F.; CHRISTMANN, A.; GRILL, E. Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. **The Plant Journal**, v.61, p.25-35, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 719p., 2004.

TAKEDA, S.; MATSUOKA, M. Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. **Nat. Rev. Genet.**, v.9, p.444-457, 2008.

TRAN, L-S; NISHIYAMA, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Potential utilization of NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach. **GM crops**, v.1, n.1, p.32-38, 2010.

TURNER, N. C.; WRIGHT, G. C.; SIDDIQUE, K. H. M. Adaptation of grain legumes (pulses) to water limited environments. **Advances in Agronomy**, v.71, p.123-193, 2001.

UMEZAWA, T.; FUJITA, M.; FUJITA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; 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.

UMEZAWA, T.; SUGIYAMA, N.; MIZOGUCHI, M.; HAYASHI, S.; MYOUGA, F.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; ISHIHAMA, Y.; HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.106, p.17588–17593, 2009.

UMEZAWA, T.; NAKASHIMA, K.; MIYAKAWA, T.; KUROMORI, T.; TANOKURA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport. **Plant Cell Physiology**. v.51, p.1821-1839, 2010.

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

VLAD, F.; RUBIO, S.; RODRIGUES, A.; SIRICHANDRA, C.; BELIN, C.; ROBERT, N.; LEUNG, J.; RODRIGUEZ, P.L.; LAURIE.; MERLOTA, S. Protein Phosphatases 2C Regulate the Activation of the Snf1-Related Kinase OST1 by Abscisic Acid in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 21, p.3170–3184, 2009.

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Plant Science**, p.1360-1385, 2004.

WISE, M. J.; TUNNACLIFFE, A. POPP the question: what do LEA proteins do. **Plant Science**, v.9, p.13-17, 2004.

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.

XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J. K. Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. **The Plant Cell**, S165-S183, 2002.

XUE, T.; ZHANG, S.; EHLTING, J.; NI, F.; JAKAB, S.; ZHONG, Y. Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and *Arabidopsis*. **BMC Genomics**, 9:550, 2008.

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

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.

YIN, P.; FAN, H.; HAO, Q.; YUAN, X.; WU, D.; PANG, Y.; YAN, C.; LI, W.; WANG, J.; YAN, N. Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. **Nature Structural Molecular Biology**, v.16, p.1230-1236, 2009.

YOSHIDA, R.; HOBO, T.; ICHIMURA, K.; MIZOGUCHI, T.; TAKAHASHI, F.; ARONSO, J.; ECKER, J.R.; SHINOZAKI, K. ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. **Plant Cell Physiology**, v.43, p.1473–1483, 2002.

YOSHIDA, R.; UMEZAWA, T.; MIZOGUCHI, T.; TAKAHASHI, S.; TAKAHASHI, F.; SHINOZAKI, K. The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. **Journal Biological Chemistry**, v.281, p.5310–5318, 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.

ZHANG, W.; QIN, C.; ZHAO, J.; WANG, X. Phospholipase D α 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2 C and regulates abscisic acid signaling. **Plant Biology**, v.25, p.9508-9513, 2004.

ZHANG, W.; RUAN, J.; HO, T-D.; YOU, Y.; YU, T.; QUATRANO, R. S. Cis regulatory element based targeted gene finding: Genome wide identification of abscisic acid and abiotic stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. **Bioinformatics**, v.21, p.3074-3081, 2005.

ZHANG, X.; YAZAKI, J.; SUNDARESAN, A.; COKUS, S.; CHAN, S.W.; CHEN, H.; HENDERSON, I.R.; SHINN, P.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, S.E.; ECKER, J.R. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. **Cell**, v.126, p.1189– 1201, 2006.

CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DE RESPOSTAS MOLECULARES E FISIOLÓGICAS DE PLANTAS DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADAS COM 35S-*AtAREB1* SOB DÉFICIT HÍDRICO

RESUMO

O estresse hídrico é uma dos principais fatores limitantes para a produtividade das culturas mundialmente. Atualmente, técnicas de engenharia genética que visam modificar os padrões de expressão de genes responsivos ao estresse hídrico constituem-se numa ferramenta poderosa para o desenvolvimento de plantas tolerantes à seca. Dentro deste contexto, os fatores de transcrição desempenham papel essencial, uma vez que eles reconhecem sequências específicas de DNA na região regulatória de genes alvos e dessa forma regulam sua expressão. AREB1 é um fator de transcrição da família zíper de leucina básico (bZIP) que se liga ao elemento ABRE na região promotora de genes induzidos por ABA. Vários trabalhos relatam que plantas super expressando AREB1 tem maior tolerância à seca. No presente estudo plantas de soja transformadas com 35S:*AtAREB1* foram caracterizadas molecularmente e fisiologicamente em condições de casa de vegetação. Observou-se que a expressão do *AtAREB1* sob controle do promotor CaMV 35 em plantas de soja não promoveu retardo no crescimento e resultou em maiores taxas de sobrevivência das plantas transformadas após déficit hídrico e re-irrigação. Plantas dos eventos 1Ea2939 e 1Eb2889 tiveram maior número total de vagens, maior número de sementes e maior massa seca de sementes. Sugere-se que a superioridade dos eventos 1Ea2939 e 1Eb2889 em relação às plantas BR 16 e evento 1Ea15 esteja relacionada com mecanismos de evitamento à seca por meio de redução na condutância estomática e transpiração foliar quando em condições de boa disponibilidade hídrica e possivelmente alterações nos perfil de expressão de fosfatases e quinases.

Palavras-chave: Ácido abscísico. Estresses abióticos. *Glycine max*. Organismos geneticamente modificados.

MARINHO, Juliane Praela. **Characterization of molecular and physiological responses of soybean plants genetically modified with 35S-AtAREB1 under water deficit**. 2014. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR.

ABSTRACT

Drought stress is one of the main limiting factors for crop productivity worldwide. Currently, genetic engineering techniques aiming to modify the expression patterns of genes responsive to drought stress constitute a powerful tool for the development of drought-tolerant plants. In this context, the transcription factors play an essential role since they recognize specific DNA sequences in the regulatory region of target genes and thereby regulate its expression. AREB1 is a transcription factor family of basic domain/leucine zipper that binds to ABRE element in the promoter region of genes induced by ABA. Several papers report that plants over-expressing *AREB1* have greater drought tolerance. In this study soybean plants transformed with *35S:AtAREB1* were characterized molecularly and physiologically in greenhouse conditions. It was observed that the expression of *AtAREB1* under control of *CaMV 35 promoter* in soybean plants did not cause growth retardation and resulted in increased survival rates of transformed plants after drought and re-watering. Plants of the events 1Ea2939 and 1Eb2889 had higher total number of pods, number of seeds and higher dry seeds weight. It is suggested that the better performance of the events 1Ea2939 and 1Eb2889 in relation to plants BR 16 and event 1Ea15 is related to drought avoidance mechanisms by reducing stomatal conductance and leaf transpiration under conditions of water availability. Changes in the expression profile of phosphatases and kinases may also be involved.

Keywords: Abscisic acid. Abiotic stresses. *Glycine max* L. Merrill. Genetically modified organisms.

INTRODUÇÃO

Os impactos das mudanças climática globais sobre a produção agrícola constituem uma das principais prioridades de pesquisa científica na última década. Para os próximos anos, várias previsões apontam para a ocorrência de alterações no regime de chuvas, resultando períodos de seca mais severos e/ou inundações e ainda para aumento do CO₂ e da temperatura atmosférica. A seca é um dos fatores que apresentam maior impacto sobre a produtividade das culturas. Neste contexto, a prospecção de genes que participam nos mecanismos de tolerância e defesa das plantas, assim como suas redes regulatórias tem se mostrado uma tarefa necessária e essencial para desenvolver plantas tolerantes à seca por meio de modificação genética (Arun et al., 2014).

O Ácido Abscísico (ABA) participa da coordenação das respostas à diminuição da disponibilidade de água e de outros estímulos ambientais em várias fases de desenvolvimento vegetal (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006). Na via de sinalização ABA-dependente, o ABA se liga diretamente à família PIR/PYL de receptores ABA, resultando na inibição da classe de fosfatases 2C (PP2C) e ativação da sinalização ABA *downstream*. Desta forma, o ABA também regula a expressão de vários genes, cujos produtos podem funcionar na tolerância à desidratação. Alguns genes desta cascata estão relacionados à síntese de protetores osmóticos e proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA) sob condições de estresse osmótico. Proteínas da classe LEA são altamente hidrofílicas e podem atuar na manutenção de água e proteção de macromoléculas em células desidratadas (Chakrabortee et al., 2007).

AREB1/ABF2 é uma proteína, dependente de ABA, que regula a expressão gênica responsiva ao estresse, atuando como principal fator de transcrição sob estresses abióticos em *Arabidopsis thaliana* (Kobayashi et al. 2008; Lee et al., 2010). Fujita et al. (2005) relataram que plantas transgênicas de *Arabidopsis*, superexpressando a forma ativa de *AREB1* exibiram hipersensibilidade a ABA e tolerância à seca. Estudos recentes têm demonstrado a importância e o potencial de proteínas AREB1 e bZIP na

tolerância ao déficit hídrico (Fujita et al., 2011; Kim et al., 2011; Reeves et al., 2011). Em 2011, Gao et al. relataram uma proteína ortóloga muito próxima de *AtAREB1/AtABF2* em soja (*GmbZIP1*), e mostraram que sua superexpressão em *Arabidopsis* melhorou a tolerância à seca.

Neste contexto científico, o presente trabalho teve como objetivos caracterizar o perfil de expressão dos genes *upstream* e *downstream* ao fator de transcrição AREB e analisar as linhagens originadas quanto a parâmetros fitométricos, fisiológicos e agronômicos sob déficit hídrico.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Neste estudo foram utilizadas linhagens de soja obtidas por meio de transformação genética da soja via biobalística e *Agrobacterium tumefaciens* utilizando respectivamente as construções *PBI35S-AREB1* e *pC3300J-35S:AREB1* (ANEXOS). O processo de transformação realizado no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja resultando em vários eventos contendo a construção *35S-AtAREB1* na geração T₀. Por meio de análises de *Southern blot* e quantificação absoluta por PCR em tempo real estimou-se o número de insertos e cópias nas plantas da geração T₁. A partir destes resultados foram selecionados três eventos nomeados 1Eb2889, 1Ea15 e 1Ea2939, as denominações 1Ea e 1Eb foram usadas para diferenciar os materiais transformados da cultivar BR 16 via *Agrobacterium* e biobalística, respectivamente. O evento 1Ea2889 apresentou 1 a 2 cópias (Barbosa et al., 2012), e os eventos 1Ea15 e 1Ea2939 apresentaram 2 e 1 inserções do transgene, respectivamente. Sementes da geração T₃ multiplicadas dos eventos selecionados foram utilizadas em experimentos moleculares, fisiológicos e agronômicos a fim de atender aos objetivos do presente trabalho.

Análise da expressão de genes induzidos por *AtAREB1*

Para a análise dos genes da cascata do *AtAREB1*, seguiu-se o delineamento inteiramente ao acaso 4x2, sendo 3 linhagens (1Ea15, 1Ea2939

e 1Eb2889) e cultivar convencional BR 16; e 2 condições hídricas (controle e déficit hídrico), com nove repetições. Sementes da geração T₃ dos eventos selecionados e da cultivar convencional BR 16 não transformada foram previamente tratadas com carboxina + tiram (200 g L⁻¹) e fipronil (250 g L⁻¹) para manutenção de sua sanidade. Posteriormente, as sementes foram dispostas em papel Germitest® umedecido com volume de água equivalente a duas vezes e meia o peso do papel seco e germinadas por 96h em câmara de germinação a 25°C ± 1 e 100% de umidade relativa. Em seguida, as plântulas foram transferidas para vasos de 1 Kg (15 cm diâmetro externo x 10 cm base x 11 cm altura) preenchidos com a mistura substrato:areia (1:1), com o substrato constituído de terra:areia:composto orgânico (3:2:2), de modo que cada vaso conteve uma única plântula. As plântulas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura programada a 28±2°C, com registros de temperatura e umidade relativa a cada 5 min por meio de termohigrógrafo (Hobo U14-002, Onset®).

O tratamento experimental das disponibilidades hídricas corresponderam a déficit hídrico (DH) e seu respectivo controle (C). O DH foi identificado com base em valores de condutância estomática (g_s) inferiores a 200 mmol H₂O m⁻² s⁻¹, enquanto a condição controle correspondeu a valores de g_s superiores a 200 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ (Flexas et al., 2004; Salinet, 2009). A condição controle correspondeu à manutenção do substrato a 100% da capacidade de campo, enquanto o DH foi induzido por suspensão total da irrigação. A manutenção da capacidade de campo a 100% foi procedida pela irrigação uma vez ao dia com volume fixo de água suficiente para saturar a mistura presente nos vasos.

Quando as plantas atingiram o estágio V₁ (Fehr et al., 1971), aquelas positivas foram identificadas via PCR convencional e mantidas a 100% da capacidade de campo até atingirem o estágio V₄ (Anexos). No estágio V₄ e um dia antes da indução do DH, os vasos foram saturados com água ao final da tarde, deixados drenar durante a noite, e na manhã seguinte foram cobertos com sacos plásticos para prevenção da perda de água por evaporação da mistura substrato:areia. O caule das plantas foi envolto com algodão a fim de se amenizar a perda de água por evaporação pela região central do vaso. A partir deste momento, a irrigação foi suspensa nos vasos pertencentes aos

grupos DH, enquanto os vasos do grupo controle permaneceram a 100% da capacidade de campo.

Um monitoramento diário da condutância estomática foi realizado até as plantas apresentarem valores de g_s inferiores a $200 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (7 dias de déficit hídrico), assim foi realizada a coleta de amostras para análise de expressão do gene *AtAREB1* e de genes da cascata. Anteriormente à coleta medidas de trocas gasosas - taxa fotossintética (A), concentração intercelular de CO_2 (C_i) condutância estomática (g_s) - e de temperatura foliar foram realizadas no folíolo central do terceiro trifólio completamente expandido sentido ápice-base por meio de um analisador portátil de fotossíntese (LI-6400XT, LI-COR) com uma fonte de luz 90% vermelha + 10% azul e câmara de 2 cm^2 . As medições foram realizadas no interior da casa de vegetação entre 9 e 11h e em boas condições de luminosidade, considerando-se as seguintes condições: radiação fotossinteticamente ativa (PAR), $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; referência de CO_2 , $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$; referência de água, $18\text{-}20 \text{ mmol mol}^{-1}$; fluxo de CO_2 , $400 \mu\text{mol s}^{-1}$.

Após a obtenção das medidas de trocas gasosas, coletou-se o terceiro trifólio totalmente expandido sentido ápice-base, o qual foi embalado em papel alumínio, mergulhado em nitrogênio líquido e armazenado a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Cabe ressaltar que no decorrer da coleta das plantas sob DH ocorreu rápido aumento da temperatura no interior da casa de vegetação, levando a um rápido decréscimo da g_s das plantas sob C (valores menores que $200 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Desta forma, para garantir que as plantas do grupo C pudessem ser coletadas em condições controle (g_s maior que $200 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), optou-se pela coleta destas no dia seguinte, cujas medidas de g_s puderam ser obtidas mais ao início do período de avaliação (mais próximas ao horário das 9h).

Análise da expressão de transcritos por RT-qPCR

Para se verificar o perfil de expressão de *AtAREB1* e de genes *upstream* e *dowstream* a este fator de transcrição nos eventos transgênicos e BR 16, foi feita análise por reação de transcrição reversa, seguida de amplificação por RT-qPCR. Os genes selecionados para análise de expressão foram: 35S-

AtAreb1, fosfatase *PP2C* (Glyma14g37480), quinase *GmSRK2* (Glyma02g15330), *GmRAB18* (Glyma09g31740). Os genes utilizados foram escolhidos baseando-se em resultados de microarranjos de cDNA de *Arabidopsis thaliana* (Yoshida et al., 2010; Fujita et al., 2009), verificando-se a provável localização desses genes em rotas metabólicas de resposta a estresses abióticos.

Para se avaliar o nível de expressão dos genes da cascata do *AREB1* nos folíolos das diferentes linhagens avaliadas, amostras de RNA total foram obtidas usando-se o reagente Trizol (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. A purificação das amostras foi feita com o *kit DNase I Amplification Grade*, (*Invitrogen Life Technologies*) com a finalidade de eliminar DNA remanescente nas amostras. Para confirmar a pureza do RNA, uma reação de PCR foi realizada utilizando-se iniciadores que amplificam íntrons do gene β -actina. Cerca de 5 μ g dos RNAs totais foram utilizados para a síntese do cDNA utilizando-se o *kit Superscript® III First Strand Synthesis System for RT-PCR* (*Invitrogen Life Technologies*). Após a síntese do cDNA, uma nova reação de PCR foi realizada para se verificar a eficiência da síntese de cDNA e, em gel de agarose, foi observada uma diferença de tamanho de 80 pb entre as bandas amplificadas do DNA genômico e do cDNA da amostra. Isto ocorreu pelo fato do cDNA não possuir íntrons, resultando então em uma banda menor que a do DNA genômico.

O desenho dos *primers* para o RT-qPCR foi realizado com o auxílio do programa *Primer Express* versão 3.0 (*Applied Biosystems*, Foster, CA, USA) (Anexos). Para cada gene e para cada tratamento, a quantificação relativa do nível de expressão gênica foi realizada em três amostras, cada qual representada por um *bulk* de três repetições biológicas (n=9). As reações foram conduzidas em termociclador 7900 HT (*Applied Biosystems*) utilizando-se o *kit SYBR® Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*), conforme as instruções do fabricante. Como gene referência foi utilizado a β -actina (acesso nº: GMU60500), o qual apresenta expressão constitutiva em todos os tecidos sob condições de déficit hídrico, Stolf-Moreira et al. (2011) (Anexos).

A eficiência da reação de amplificação para os genes em estudo foi estimada por meio de diluições seriadas de cDNAs (1x, 5x, 25x, 125x e 625x) (Anexos). Os parâmetros de ciclagem para as reações de amplificação foram

50 °C por 2 min e 95 °C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. A especificidade dos produtos amplificados foi avaliada pela análise das curvas de dissociação geradas logo após o final de cada reação de quantificação. Na dissociação, os produtos de amplificação foram submetidos a temperaturas de 60 a 95 °C.

Para calcular a eficiência da reação foi aplicada a fórmula: $E = [10^{-1/\text{slope}}] - 1$. A expressão relativa foi determinada pela normalização com o gene referência β -actina para as plantas controle (C) e submetidas ao déficit hídrico (DH). A expressão foi calculada pelo método $2^{-(DCt)}$, onde $DCt = Ct_{\text{experimental}} - Ct_{\text{normalizador}}$.

Parâmetros de florescimento e rendimento

As plantas avaliadas no experimento da análise de expressão foram também caracterizadas, quanto às diferenças no período de florescimento. Esta avaliação foi realizada no início do ciclo reprodutivo (R1/R2), em dois dias distintos, quanto à presença ou ausência de flores.

Posteriormente, as plantas foram transferidas para vasos maiores (8 Kg) contendo a mesma composição substrato:areia (1:1) e mantidas em condições bem irrigadas até o final do ciclo. Realizou-se fertilização da composição com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) duas vezes por semana.

Ao final do ciclo reprodutivo, alguns parâmetros de rendimento (por planta) foram avaliados: número total de vagens, número total de sementes, massa seca total de vagens, número de sementes viáveis, massa seca de sementes viáveis, massa seca total de sementes.

Análise da taxa de sobrevivência e transpiração

Neste ensaio, a porcentagem de dano foliar/sobrevivência das plantas geneticamente modificadas com as construções *AtAREB1* e a cultivar BR 16 foram comparadas. Pelo fato da sobrevivência sob déficit hídrico poder ser decorrente de menor uso de água causada por fechamento estomático ou diferenças na área foliar, diferenças na transpiração também foram avaliadas.

Sementes da geração T₃ dos eventos selecionados e da cultivar BR 16 foram plantadas em vasos de 1 kg com substrato constituído de uma mistura de substrato:areia 1:1 (substrato 3:2:2), com o substrato constituído de terra:areia:composto orgânico. As plantas foram mantidas com bom suprimento de água (100% da capacidade de campo) até o estágio V₂. Quando as plantas atingiram este estágio, os vasos foram saturados com água e envoltos em saco plástico para evitar evaporação de água diretamente do substrato. O caule das plantas foi envolto com algodão a fim de se amenizar a perda de água por evaporação pela região central do vaso. A partir daí a irrigação foi suspensa (17 dias). O delineamento usado foi o de blocos ao acaso com 3 linhagens e a cultivar BR 16, e 10 blocos, totalizando 40 parcelas.

Durante o período de déficit hídrico, foi realizada a avaliação da transpiração pela diferença na perda de água entre dias sucessivos, expressa em g dia⁻¹, por meio da pesagem diária dos vasos sempre a partir das 9h. Após 17 dias de déficit hídrico, quando todas as BR16 apresentaram 100% de mortalidade, as plantas foram reidratadas e, no sétimo dia de reidratação (novamente à 100% da capacidade de campo), quando as plantas apresentaram evidente recuperação ao déficit hídrico, foi contado o número de plantas que sobreviveram ao déficit (Exemplo: 7 em 10=70%).

Análise de crescimento

Este experimento foi conduzido com o objetivo de verificar se a transformação genética usando-se o promotor constitutivo 35S retardou ou não o crescimento das plantas transformadas. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 4x2x2: três linhagens (BR 16, 1Ea15, 1Ea2939 e 1Eb2889) e a cultivar BR 16; duas disponibilidades hídricas (C e DH) e duas épocas de avaliação e coleta de material, com cinco blocos, totalizando 80 parcelas.

As plantas foram mantidas com bom suprimento de água (100% da capacidade de campo) até o estágio V₃. Ao atingirem este estágio, realizou-se a primeira avaliação (ainda em condições de boa disponibilidade hídrica) e coleta do material vegetal, caracterizada inicialmente pela contagem do número

de nós (NNOS), e medição da área foliar total inicial (dm^2) pelo equipamento LI-3100C. Em seguida, os diferentes tecidos coletados (raízes e lâminas foliares) foram armazenados separadamente em sacos de papel e secos em estufa a 60°C para obtenção de massa seca constante, a qual foi pesada em balança com sensibilidade de 0,1g.

Após esta primeira coleta, os vasos remanescentes foram saturados com água e envoltos em saco plástico para se evitar evaporação de água diretamente do substrato. A partir deste momento, a irrigação foi suspensa nas plantas do grupo DH, enquanto o grupo C permaneceu a 100% da capacidade de campo. Ao décimo quinto dia, quando as plantas encontravam-se visualmente sob déficit hídrico, realizou-se a segunda coleta do material vegetal com as mesmas avaliações descritas na avaliação inicial, além da determinação do potencial hídrico do substrato (MPa) no grupo DH por meio de um potenciômetro modelo WP4C (Decagon).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fenótipo de plantas de soja transformadas com *35S-AREB1*

Inicialmente, foi observado que nos estádios iniciais do desenvolvimento das plântulas (ainda em condições de boa disponibilidade hídrica), designadas ao tratamento DH, ocorreram diferenças no crescimento dos eventos GMs 1Ea2939 e 1Eb2889 em relação à cultivar convencional BR 16. Notou-se ainda que o evento 1Ea15 apresentou maiores valores iniciais de massa seca de raiz (MSR), massa seca de lâmina foliar (MSLF) e área foliar total (AF) (Tabela 1).

No entanto, ao final do período experimental não houveram diferenças para os parâmetros massa seca de raiz, massa seca de lâminas foliares e área foliar total quando plantas foram comparadas sob condições bem irrigadas e sob déficit hídrico. Estes resultados permitem inferir que a transformação de plantas de soja com o transgene *35S-AtAREB1* sob o controle do promotor constitutivo *CaMV 35S* não alterou as características de crescimento das plantas transformadas. Cabe destacar que o evento 1Ea15, no entanto, apresentou características de crescimento superiores em relação a BR 16 e as linhagens GMs 1Ea2939 e 1Eb2889 (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros de crescimento de plantas de soja *AtAREB* geneticamente modificadas e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16).

Avaliação Inicial			
Tratamentos	Características fenotípicas		
Controle	MSR	MSLF	AF
BR 16	0,75±0,05ab	0,52±0,02b	152,53±12,98a
1Ea15	0,84±0,08ab	0,62±0,02a	178,21±16,30a
1Ea2939	0,66±0,09b	0,53±0,04b	141,83±14,56a
1Eb2889	0,96±0,09a	0,53±0,02b	147,57±6,45a
Déficit Hídrico			
BR 16	0,91±0,15b	0,58±0,02b	166,27±7,26ab
1Ea15	1,26±0,09a	0,68±0,06a	192,23±17,99a
1Ea2939	0,63±0,06c	0,48±0,02c	129,95±6,76bc
1Eb2889	0,58±0,05c	0,44±0,03c	121,37±10,83c
Avaliação Final			
Tratamentos			
Controle	MSR	MSLF	AF
BR 16	1,09±0,08Aa	0,80±0,03Ab	171,77±29,15Aab
1Ea15	1,02±0,06Aa	1,11±0,01Aa	206,10±21,08Aa
1Ea2939	1,02±0,10Aa	0,76±0,04Abc	181,54±11,40Aab
1Eb2889	0,91±0,14Aa	0,71±0,02Ac	155,07±24,34Ab
Déficit Hídrico			
BR 16	0,88±0,08Aa	0,62±0,01Ba	102,73±4,30Ba
1Ea15	0,91±0,01Aa	0,67±0,02Ba	115,47±13,05Ba
1Ea2939	0,76±0,06Ba	0,63±0,05Ba	140,42±14,25Ba
1Eb2889	0,89±0,04Aa	0,64±0,03Aa	134,01±14,33Aa

MSR= massa seca de raiz; MSLF= massa seca de lamina foliar; AF= area foliar.

Médias (número de repetições = 5) ± erro padrão seguidas de letras maiúsculas (dentro dos eventos e BR 16; entre condições hídricas) e letras minúsculas (dentro da condição hídrica; entre os eventos) iguais não diferem entre si pelo teste Duncan ($p \leq 0.05$).

Conforme descrito na literatura, o promotor 35S é frequentemente associado ao retardo no crescimento (Kasuga et al., 1999; Kasuga et al., 2004; Morran et al., 2011). Plantas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando *DREB1A* apresentaram severo retardo no crescimento em condições controle. Em tomate, plantas superexpressando *CBF1* sob controle deste promotor

tiveram um fenótipo anão em condição de boa disponibilidade hídrica (Hsieh et al., 2002a, 2002b).

Em soja, Barbosa et al. (2012) trabalharam com plantas GMs com a mesma construção (*pBI35S-AREB1*) e observaram que, dentre os eventos com baixo número de cópias do transgene, o evento A24.10 apresentou leve redução no número de folhas e o evento A2057.03 não apresentou nenhum retardo no crescimento.

No presente estudo, as interações entre genótipo e condição hídrica e entre as condições hídricas não apresentaram significância para a taxa de crescimento relativo diária (TCR_dia). O evento 1Ea2939 apresentou maior taxa de crescimento relativo diária ao longo do período experimental em relação ao evento 1Ea15, e não diferiu estatisticamente dos demais materiais vegetais (Tabela 2). As linhagens 1Ea2939 e 1Eb2889 tiveram maior número de nós quando comparadas com os demais materiais em condições de déficit hídrico (Tabela 3). Esta característica (número de nós) está diretamente relacionada com o rendimento final das linhagens, uma vez que este parâmetro é frequentemente associado ao número de vagens por unidade de área. Quanto mais nós, maior o número das estruturas de suporte de vagens, que desempenham papel fundamental na determinação do rendimento (Egli, 2012).

Tabela 2. Taxa de crescimento por dia de plantas de soja *AtAREB* geneticamente modificadas e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16).

Genótipos/linhagens	TCR_dia
BR 16	0,02±0,01ab
1Ea15	0,01±0,01b
1Ea2939	0,03±0,01A
1Eb2889	0,03±0,01ab

TCR_dia = Taxa de Crescimento Relativo por dia. Valores representam médias (número de repetições = 10) ± erro padrão. Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste Duncan ($p \leq 0.05$).

Tabela 3 – Número de nós de plantas de soja *AtAREB* geneticamente modificadas e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16).

Genótipos/linhagens	NNOS	
	C	DH
BR 16	6,80±0,44A	5,70±0,21B
1Ea15	6,90±0,35A	6,30±0,21B
1Ea2939	6,20±0,25A	5,90±0,28A
1Ea2889	6,20±0,25A	6,10±0,23A

NNOS (número de nós). C (controle). DH (déficit hídrico). Valores representam médias (número de repetições = 10) ± erro padrão. Médias seguidas de mesmas letras dentro de cada condição hídrica não diferem pelo teste Duncan ($p \leq 0.05$).

Trocas gasosas das plantas de soja transformadas com a construção 35S-AREB1

Sob boa disponibilidade hídrica os eventos GMs 1Ea2939 e 1Eb2889 apresentaram menor valor de condutância estomática (g_s), enquanto que, sob déficit hídrico, estes genótipos apresentaram maiores valores de g_s em relação à cultivar convencional BR 16 e o evento 1Ea15 (Figura 1).

Diferenças na g_s e/ou área foliar das plantas resultaram em diferenças na forma com que as plantas exauriram água do solo, de modo que aquelas com maiores g_s (BR 16 e 1Ea15) e/ou área foliar exauriram água do solo mais rapidamente devido à maiores taxas de transpiração. Segundo Lawlor (2013), este exaurimento diferencial da água do solo é de extrema importância na interpretação de experimentos onde se estuda a tolerância de plantas ao déficit hídrico. De acordo este autor, o retardo no aparecimento de sintomas de déficit hídrico em determinados materiais vegetais transgênicos ou cultivares convencionais consideradas tolerantes podem ser resultados das diferenças na taxa de perda de água por transpiração. Conseqüentemente, no decorrer do período experimental, o metabolismo das plantas com maiores taxas de transpiração é prejudicado em relação àquelas com menores taxas de transpiração. Desta forma, tal mecanismo está associado ao evitamento à seca em contrapartida aos mecanismos de tolerância à seca.

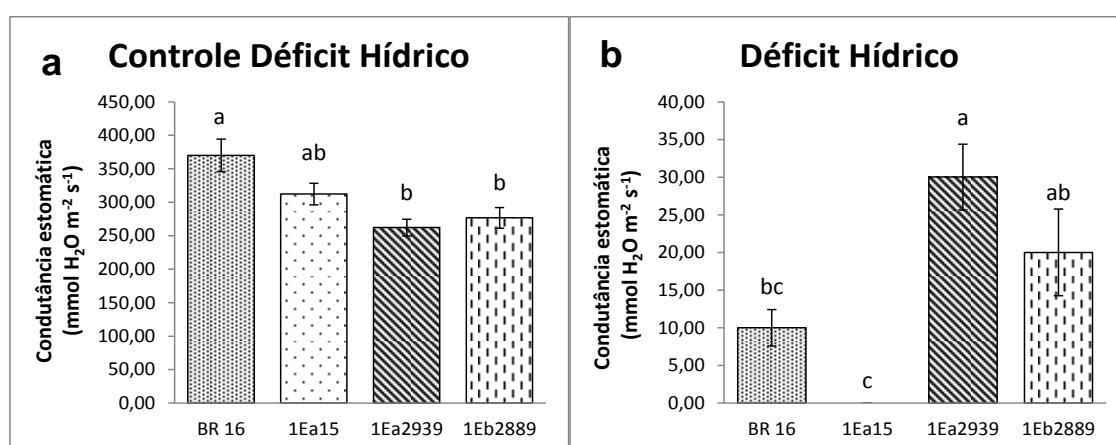


Fig. 1 Condutância estomática de plantas *AtAREB* geneticamente modificadas e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16). a) controle. b) déficit hídrico. Valores representam médias \pm erro padrão; número de repetições = 9. Em cada condição hídrica, médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste Duncan ($p \leq 0.05$).

A redução na g_s nos eventos GMs 1Ea2939 e 1Eb2889 resultou em menor concentração interna de CO_2 na situação controle, entretanto essa redução na g_s não foi suficiente para promover alterações na taxa fotossintética em relação às plantas BR 16 e 1Ea15 (Figura 2ac). Para os eventos 1Ea2939 e 1Eb2889 também foi observado um consumo de CO_2 sob déficit hídrico em relação à situação controle, enquanto que para a cultivar BR 16 e para o evento 1Ea15 o CO_2 interno acumulou-se ocasionando reduções nas taxas fotossintéticas.

Embora exista um consenso na literatura de que a principal causa de redução na fotossíntese sob déficit hídrico seja resultado de fechamento estomático, menor condutância mesofílica e comprometimento metabólico, decréscimos na atividade da rubisco, podem ocorrer e causar quedas nas taxas fotossintéticas (Flexas et al., 2004a; Flexas e Medrano, 2002; Bota et al., 2004).

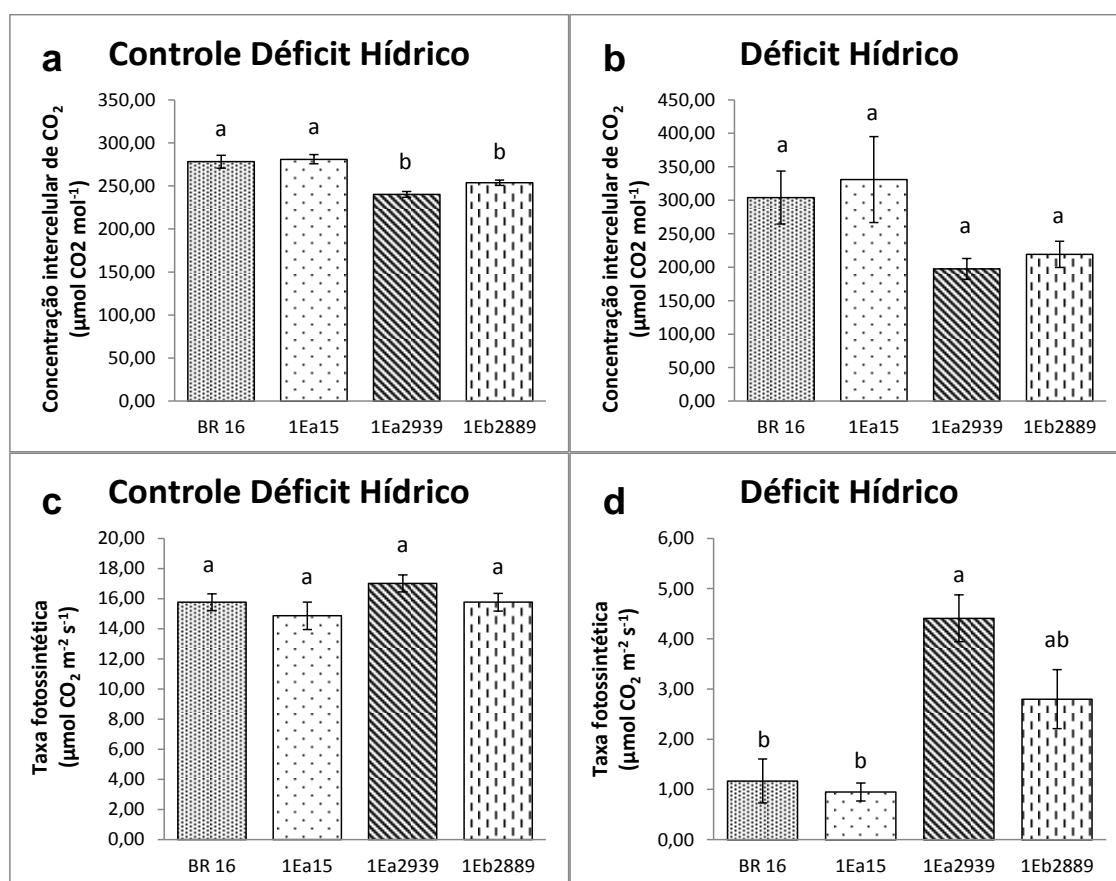


Fig. 2 Concentração intercelular de CO_2 e taxa fotossintética de plantas AtAREB geneticamente modificadas e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16). a) Concentração intercelular de CO_2 de plantas sob controle. b) Concentração intercelular de CO_2 de plantas sob déficit hídrico. c) Taxa fotossintética de plantas sob controle. d) Taxa fotossintética de plantas sob déficit hídrico. Valores representam médias \pm erro padrão; número de repetições = 9. Em

cada condição hídrica, médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$).

Para plantas C3, como a soja, a atividade da Rubisco não é afetada por déficit hídrico quando a g_s é $>50-100 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$, independente da cultivar. Ao contrário, quando a g_s cai abaixo deste valor a atividade da Rubisco pode declinar dependendo da espécie e/ou condições ambientais (Flexas e Medrano, 2002; Lawlor e Cornic, 2002; Tezara et al., 2002; Bota et al., 2004; Flexas et al., 2004a; Ennahli e Earl, 2005).

Neste trabalho, os valores de g_s da cultivar BR 16 e 1Ea15 estavam abaixo daqueles dos eventos 1Ea2939 e 1Eb2889 e todos abaixo de $50 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Entretanto, para os eventos 1Ea2939 e 1Eb2889 foi observada a manutenção da atividade fotossintética, enquanto que, para a cultivar BR 16 e para o evento 1Ea15 observou-se desaceleração ou mesmo paralisação do processo fotossintético sob déficit hídrico.

Transpiração de plantas de soja transformadas com a construção 35S-AtAREB1 e potencial hídrico do substrato de cultivo

Dados de transpiração ao longo do período experimental revelaram que, nos dias iniciais, após a suspensão da irrigação e imposição do déficit hídrico (2-3 dias), a transpiração da cultivar convencional BR 16 e do evento 1Ea15 estava superior à dos demais eventos transgênicos (Figura 3). Muito provavelmente tal fato ocorreu em função da maior g_s destes eventos sob condição controle (Figura 1a). As diferenças nas taxas transpiratórias entre os materiais vegetais no início da suspensão da irrigação, fez com que ao final do período experimental, o substrato contendo os eventos 1Ea2939 e 1Eb2889 estivessem com melhor *status* hídrico. Desta forma estas plantas passaram a ter taxas transpiratórias superiores, em relação às plantas BR 16 e 1Ea15.

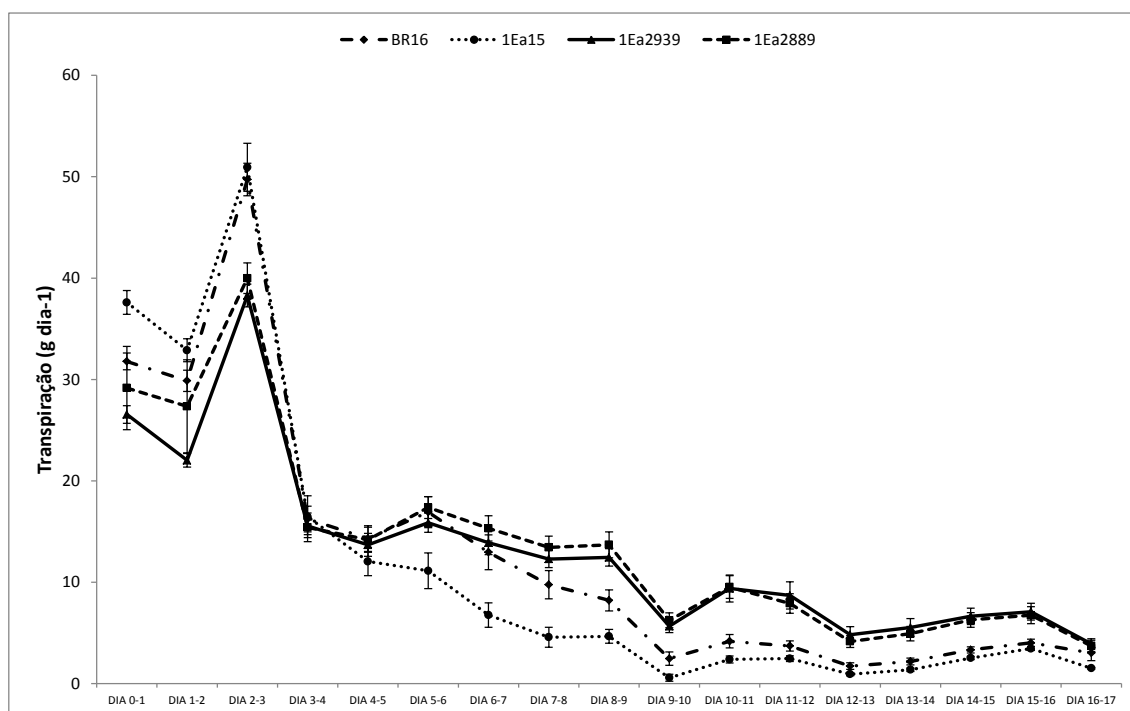


Fig. 3 Transpiração diária das plantas *AtAREB* geneticamente modificadas e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16) sob déficit hídrico. Valores representam médias \pm erro padrão, $n=10$.

O armazenamento de água no substrato contendo os eventos transgênicos pôde ser confirmado pelo dado de potencial hídrico do substrato ao final do período experimental. Assim, como observado na Figura 4 o potencial hídrico do substrato contendo plantas dos eventos GMs 1Ea2939 e 1Eb2889 foi superior quando comparado àquele contendo as plantas BR 16 e 1Ea15.

Alguns autores relataram em milho (Ray e Sinclair, 1998), soja (Vadez e Sinclair, 2001; Hufstetler et al., 2007) e amendoim (Bhatnagar-Mathur et al., 2007) que declínio na transpiração, quando o substrato está relativamente úmido, resulta na conservação de água no solo.

De acordo com Tuberosa (2012), tal mecanismo de conservação pode ser considerado vantajoso no caso de um longo período de seca, uma vez que a água armazenada no solo pode ser disponibilizada para uso em estádios posteriores. Por outro lado, esta característica não seria vantajosa em condições de período de seca curto, pois acarretaria uma diminuição na captura de luz e fixação do carbono ocasionando perdas na produção ou redução no crescimento.

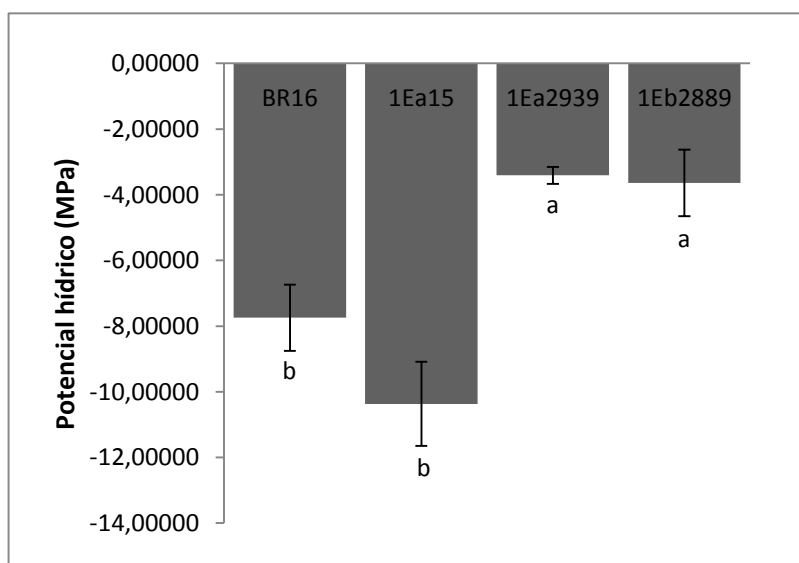


Fig. 4 Potencial hídrico do substrato usado para o cultivo de plantas *AtAREB* geneticamente modificadas e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16) sob déficit hídrico. Valores representam médias \pm erro padrão, número de repetições = 5. Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$).

Florescimento e Respiração de plantas de soja transformadas com a construção 35S-AREB1

As plantas BR 16 e 1Ea15 iniciaram o florescimento mais precocemente do que plantas 1Ea2939 e 1Eb2889 (Figura 5). O aceleração do ciclo destas plantas pode ter colaborado para estratégia de escape à seca (Heatherly e Elmore, 2004). Este comportamento não foi observado para as plantas dos eventos GMs 1Ea2939 e 1Eb2889 sendo que, na situação controle estas plantas apresentaram estratégia de evitamento à seca por meio da diminuição da condutância estomática, mecanismo não observado nas plantas BR 16 e 1Ea15 (Lawlor, 2013).

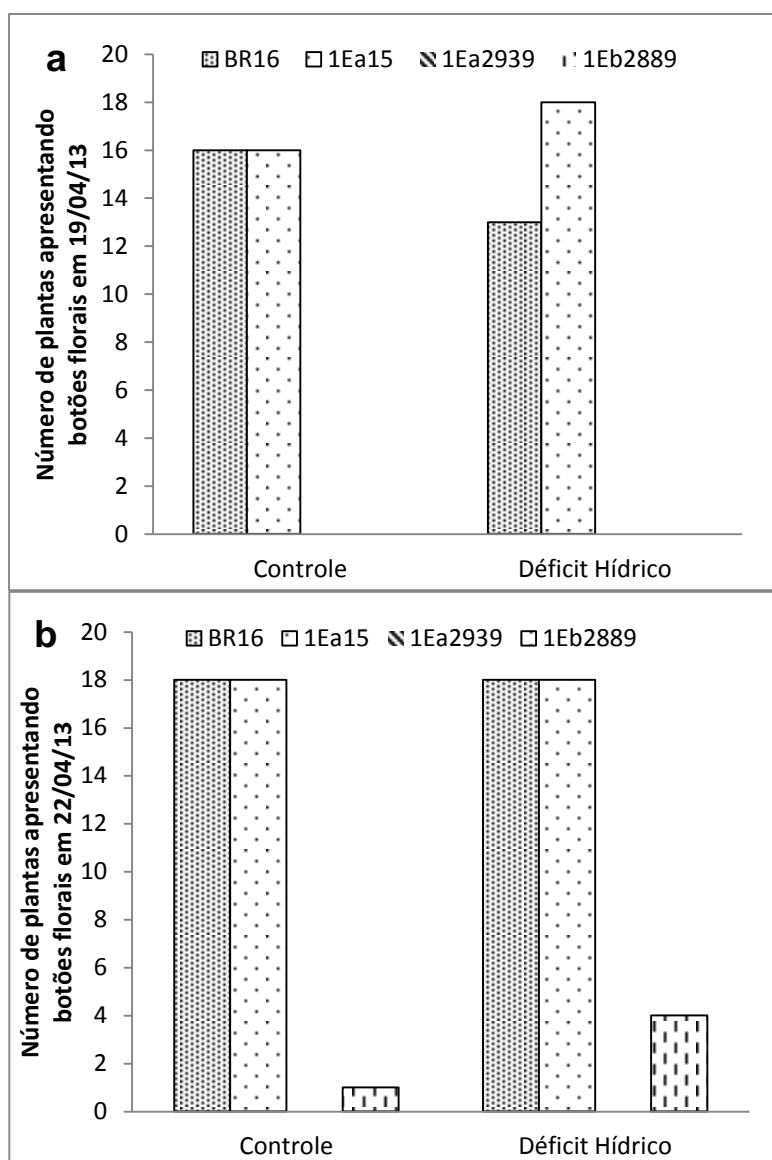


Fig. 5 Características fenotípicas de plantas *AtAREB* geneticamente modificadas para tolerância à seca e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16). a) número de plantas apresentando botões florais em 19/04/2013. b) número de plantas apresentando botões florais em 22/04/2013.

Lawlor (2013) relatou que, em culturas anuais como os cereais, o crescimento vegetativo explora o período de chuvas em regiões com estações pronunciadas de secas e chuvas e, a maturação de grãos ocorre nos períodos de seca, desta forma as plantas são capazes de escapar da seca.

Outra evidência para o fato de que as plantas BR 16 e 1Ea15 atingiram níveis elevados de déficit hídrico do que plantas 1Ea2939 e 1Eb2889 durante o período experimental foi a predominância nesses materiais vegetais de

processos catabólicos (respiração) em detrimento dos processos anabólicos (fotossíntese) (Figura 6).

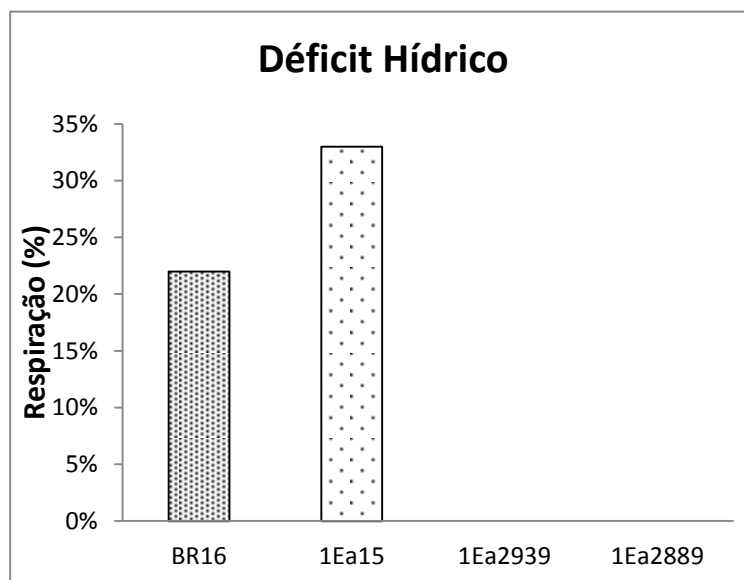


Fig. 6 Respiração das plantas *AtAREB* geneticamente modificadas e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16) sob déficit hídrico. Valores representam médias \pm erro padrão, número de repetições = 9.

Expressão do transgene *AtAREB1* e do gene *GmRAB18* em plantas de soja sob condições de déficit hídrico

A expressão do transgene *AtAREB1* foi observada nos eventos 1Ea2939 e 1Eb2889. Porém, não foi detectada no evento 1Ea15. Os níveis de expressão foram levemente maiores na condição controle. Contudo, a diferença entre as duas condições (controle e déficit hídrico) foi inferior a 1x, pois o *AtAREB1* foi detectado nos eventos transgênicos a uma baixa taxa de transcrição (Figura 7) devido à expressão constitutiva do promotor 35S.

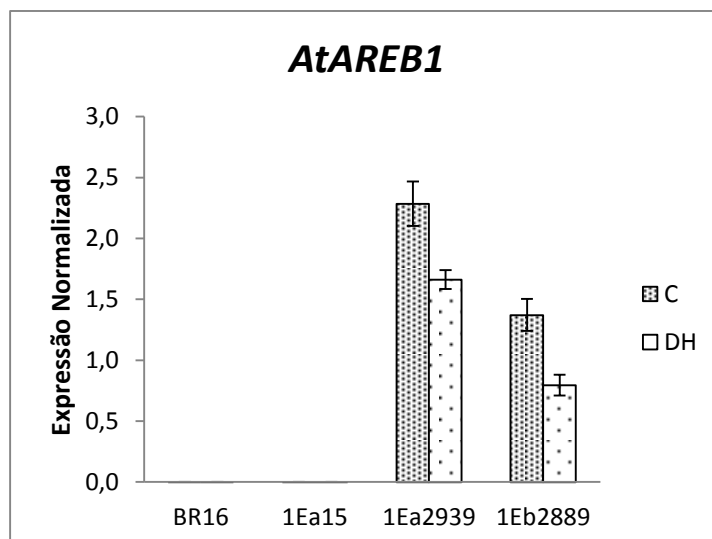


Fig. 7 Nível de expressão do transgene *AtAREB1* na cultivar BR 16 e em eventos GMs 1Ea15, 1Ea2939, 1Eb2889 em controle (C) e déficit hídrico (DH). A expressão foi normalizada com o gene de referência *Gmβ-actina*. Valores representam médias \pm erro padrão; número de repetições = 9.

O gene *GmRAB18*, responsivo ao déficit hídrico, foi significativamente expresso (aproximadamente 20x) nas plantas BR 16 e no evento 1Ea15 sob condições de déficit hídrico (Figura 8). Nos eventos 1Ea2939 e 1Eb2889, a expressão deste genes foi relativamente menor (cerca de 5x para ambos os eventos) (Figura 8). Este resultado corrobora os resultados da condutância estomática e transpiração diária (Figuras 1A e 3), mostrando que na condição DH os eventos 1Ea2939 e 1Eb2889 alcançaram níveis de estresse moderado enquanto as plantas BR 16 e o evento Ea15 atingiram níveis de estresse severo. Como elucidado anteriormente, tal fato pode ter ocorrido em função do fechamento estomático na condição controle, que antecedeu o período de imposição do déficit hídrico e uso conservativo da água presente no substrato das plantas 1Ea2939 e 1Eb2889 (Figura 4).

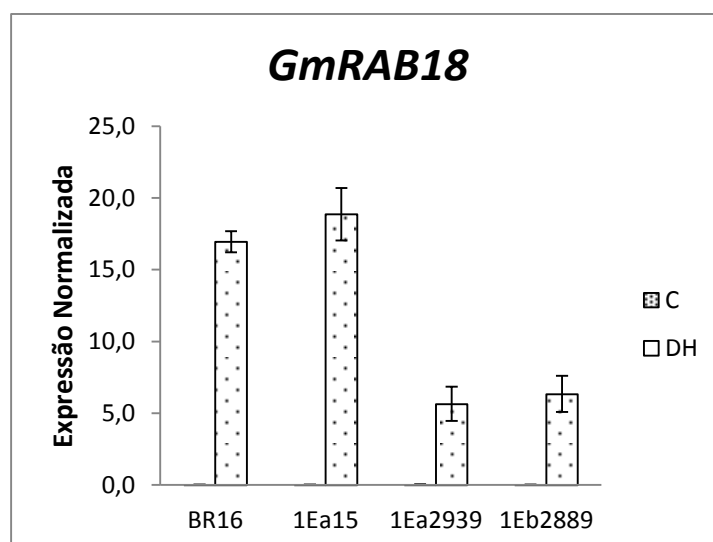


Fig. 8 Nível de expressão do gene *GmRAB18* na cultivar BR 16 e em eventos GMs 1Ea15, 1Ea2939, 1Eb2889 em controle (C) e déficit hídrico (DH). A expressão foi normalizada com o gene de referência *Gmβ-actina*. Valores representam médias \pm erro padrão; número de repetições = 9.

O *AtRAB18* codifica uma proteína hidrofílica rica em glicina (18.5 kDa), que contém um domínio rico em serina e lisina conservado característico de proteínas RAB semelhantes em outras espécies. O RNA mensageiro de RAB18 acumula-se em plantas expostas à baixa temperatura, déficit hídrico ou aplicação de ABA exógeno, mas não em plantas submetidas ao choque térmico (Iuchi et al., 2001). Resultados obtidos por este autor propiciaram evidência genética direta para a regulação ABA-dependente do gene RAB18 de *A. thaliana*. A importância do ABA endógeno para a expressão do Rab18 tem sido demonstrada em vários estudos (Yoshida et al., 2010; Bauer et al., 2013; Marcolino et al., 2014). Contudo, a expressão deste gene sob condições de déficit hídrico também está associada à regulação ABA-independente (Iuchi et al., 2001). Marcolino et al., (2014) também detectaram a expressão de *GmRAB18* em plantas da cultivar BR 16 sob condições de déficit hídrico moderado. Entretanto, apenas sob condições de estresse severo a expressão do gene foi induzida significativamente (mais que 2000x comparado ao controle).

De acordo com os resultados observados no presente estudo, a alta expressão deste transcrito em BR 16 e na 1Ea15 está, possivelmente,

associada ao estresse severo ao qual as plantas BR 16 e 1Ea15 foram submetidas, conforme demonstrado nas Figuras 1a, 2 e 3.

Possível relação entre fechamento estomático e perfil de expressão de quinases e fosfatases

A via de sinalização por ABA é composta pelo hormônio que ligado a proteínas PYR/RCAR, fosfatases (PP2C) e quinases (SnRK2) medeiam a transmissão do sinal (Melcher et al., 2009; Umezawa et al., 2009). De acordo com este mecanismo, o ABA se liga às proteínas PYR/RCAR liberando SNRK2 da repressão induzida pelas PP2Cs. Uma vez ativada, as quinases fosforilam os fatores de transcrição que ativam genes responsivos ao ABA (na via de sinalização no núcleo celular). No entanto, no citoplasma da célula, as quinases podem, ainda, fosforilar canais aniônicos lentos (SLAC1) ou os canais de potássio (kat1) para induzir fechamento estomático em resposta ao ABA (Umezawa et al., 2010). Sabe-se que o mecanismo de fechamento estomático constitui uma das primeiras respostas do vegetal ao déficit hídrico, e visa principalmente diminuir a perda de água para o ambiente, conservando-a no espaço celular.

No presente estudo, observou-se nos eventos GMs 1Ea2939 e 1Eb2889, que sob a condição controle, ocorreu redução na condutância estomática. Este mecanismo pode estar associado, ao perfil de expressão do transcrito da fosfatase nos eventos GMs 1Ea2939 e 1Eb2889, que foi relativamente menor se comparado ao perfil observado para o transcrito da proteína quinase em relação ao evento 1Ea15 e plantas BR 16 (Figura 9). Entretanto, como baixos níveis de expressão foram observados, sugere-se que mais estudos sejam realizados no sentido de elucidar um possível envolvimento da redução/elevação desses transcritos com a redução na g_s em condições com boa disponibilidade hídrica.

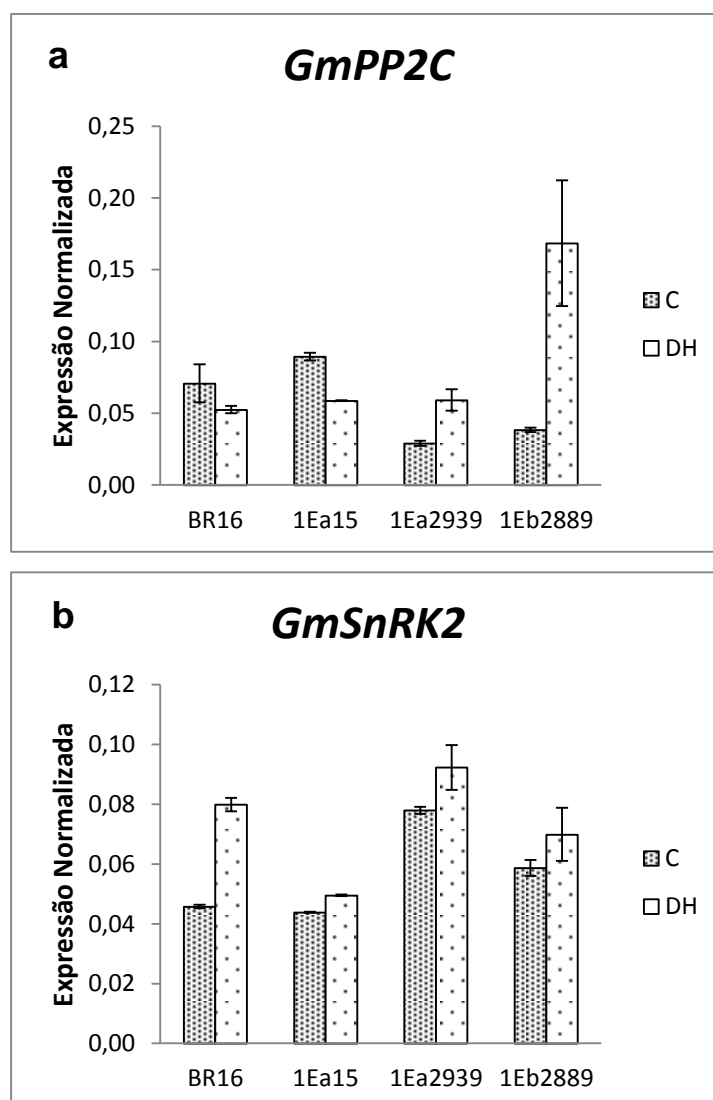


Fig. 9 Nível de expressão do gene *GmPP2C* e *GmSnRK2* na cultivar BR 16 e em eventos GMs 1Ea15, 1Ea2939, 1Eb2889 em controle (C) e déficit hídrico (DH). A expressão foi normalizada com o gene de referência *Gmβ-actina*. Valores representam médias \pm erro padrão; número de repetições = 9.

Tendo em vista que existem relatos na literatura que relatam que a expressão de *NtPP2C 1* é fortemente induzida por seca mas reprimida por estresse oxidativo e calor (Vranová et al., 2000), verificou-se no presente estudo a expressão relativa das fosfatases e quinases nos materiais vegetais mantidos em condições bem irrigadas e nos quais a temperatura da folha estava a 27 ou 34°C em média.

Assim, sugere-se que, em condições bem irrigadas, à medida que a temperatura aumentou de 27°C para 34°C ocorreu uma elevação nível de expressão das quinases nos eventos 1Ea2939 e 1Eb2889 em relação à plantas

1Ea15 e BR 16 (Figura 10b). Com relação aos transcritos das fosfatases observou-se diferenças no perfil de expressão entre BR 16 e 1Ea15 e eventos 1Ea2939 e 1Eb2889 (Figura 10a), sendo que nestes eventos a elevação da temperatura pode ter promovido uma queda na atividade das PP2Cs.

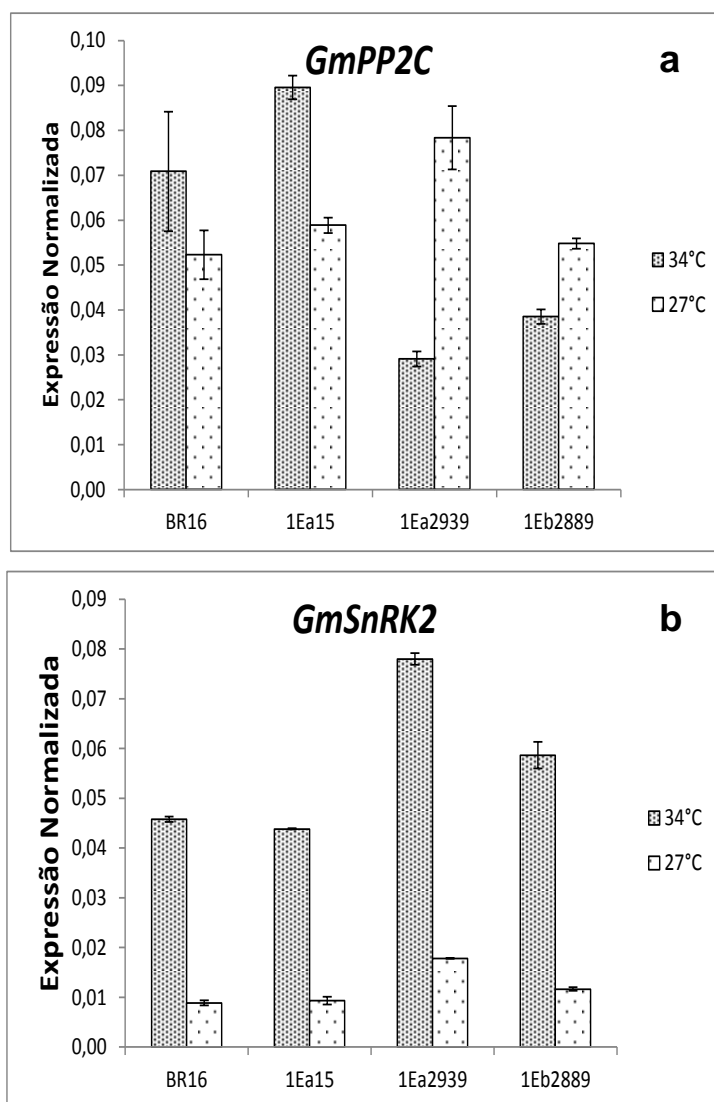


Fig. 10 Nível de expressão do gene (a) *GmPP2* e (b) *GmSnRK2* na cultivar BR 16 e em eventos GMs 1Ea15, 1Ea2939, 1Eb2889 para plantas cultivadas em condições controle em que as temperaturas foliares atingiram 27 e 34°C. A expressão foi normalizada com o gene de referência *Gmβ-actina*. Valores representam médias \pm erro padrão; número de repetições = 9.

Taxa de sobrevivência e componentes de rendimento de plantas de soja transformadas com *35S-AREB1*

As diferenças na expressão gênica e comportamento fisiológico dos eventos 1Ea2939 e 1Eb2889 refletiram na sua taxa de sobrevivência e nos

componentes de rendimento. Após 17 dias de suspensão da irrigação e re-irrigação por sete dias, foi observado que as plantas da cultivar BR 16 e do evento 1Ea15 apresentaram 100% de morte, enquanto as plantas dos eventos GMs 1Ea2939 e 1Eb2889 tiveram 60% e 40% de sobrevivência, respectivamente (Figura 11).

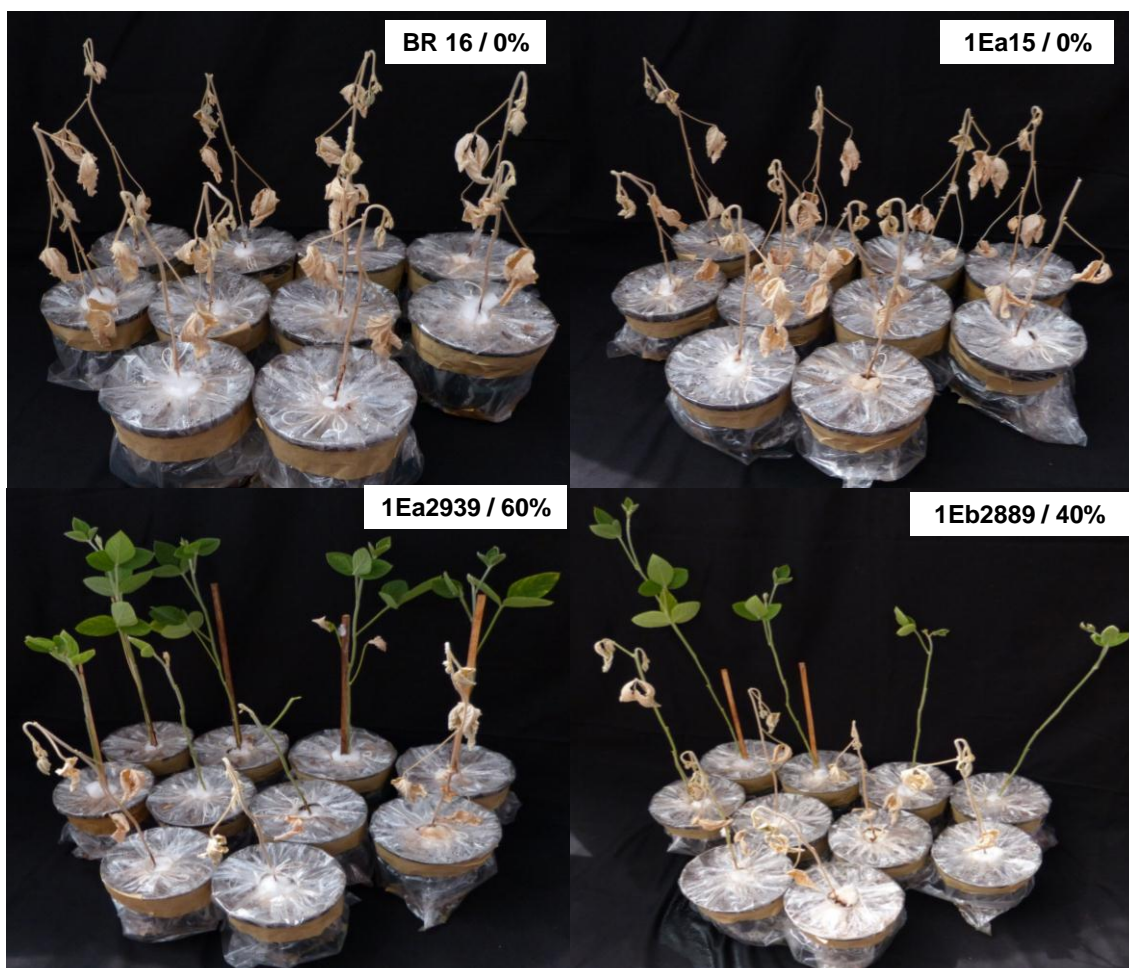


Fig. 11 Taxa de sobrevivência de plantas *AtAREB* geneticamente modificadas para tolerância à seca e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16). Estas plantas ficaram sem irrigação por 17 dias (estresse severo). Na foto, pode-se observar que após sete dias a re-irrigação as plantas BR 16 e 1Ea15 não apresentaram recuperação, diferentemente dos eventos GMs 1Ea 2939 e 1Eb2889.

As análises do rendimento realizadas em casa de vegetação mostraram que a transformação das plantas de soja com o gene *AtAREB1* sob controle do promotor constitutivo 35S, o qual é frequentemente relacionado com anomalias no crescimento, não prejudicou o desempenho das plantas transformadas. Para o evento 1Ea2939 obteve-se maior número total de vagens, maior massa seca total de vagens, maior número de sementes viáveis, maior massa seca de

sementes viáveis, maior massa seca total de sementes e maior número total de sementes por planta (Figuras 12 e 13).

De modo geral, a superioridade nos componentes de rendimentos em relação à BR 16 foi observada para o evento GM 1Ea2939 seguido pelo evento 1Eb2889. Sugere-se que a superioridade nesses eventos esteja relacionada com o uso conservativo de água em situação de boa disponibilidade hídrica com consequente armazenamento de água para uso posterior. Entretanto, é possível que mecanismos de tolerância relacionados à expressão de genes responsivos ao estresse hídrico estejam também envolvidos. Sendo assim, vias moleculares, fisiológicas e bioquímicas responsivas à seca podem estar sendo ativadas em condição de boa disponibilidade hídrica e mesmo estando em níveis inferiores àqueles que ocorrem sob situação de déficit hídrico, podem conferir vantagens adaptativas para os eventos transgênicos quando do surgimento da condição de escassez de água.

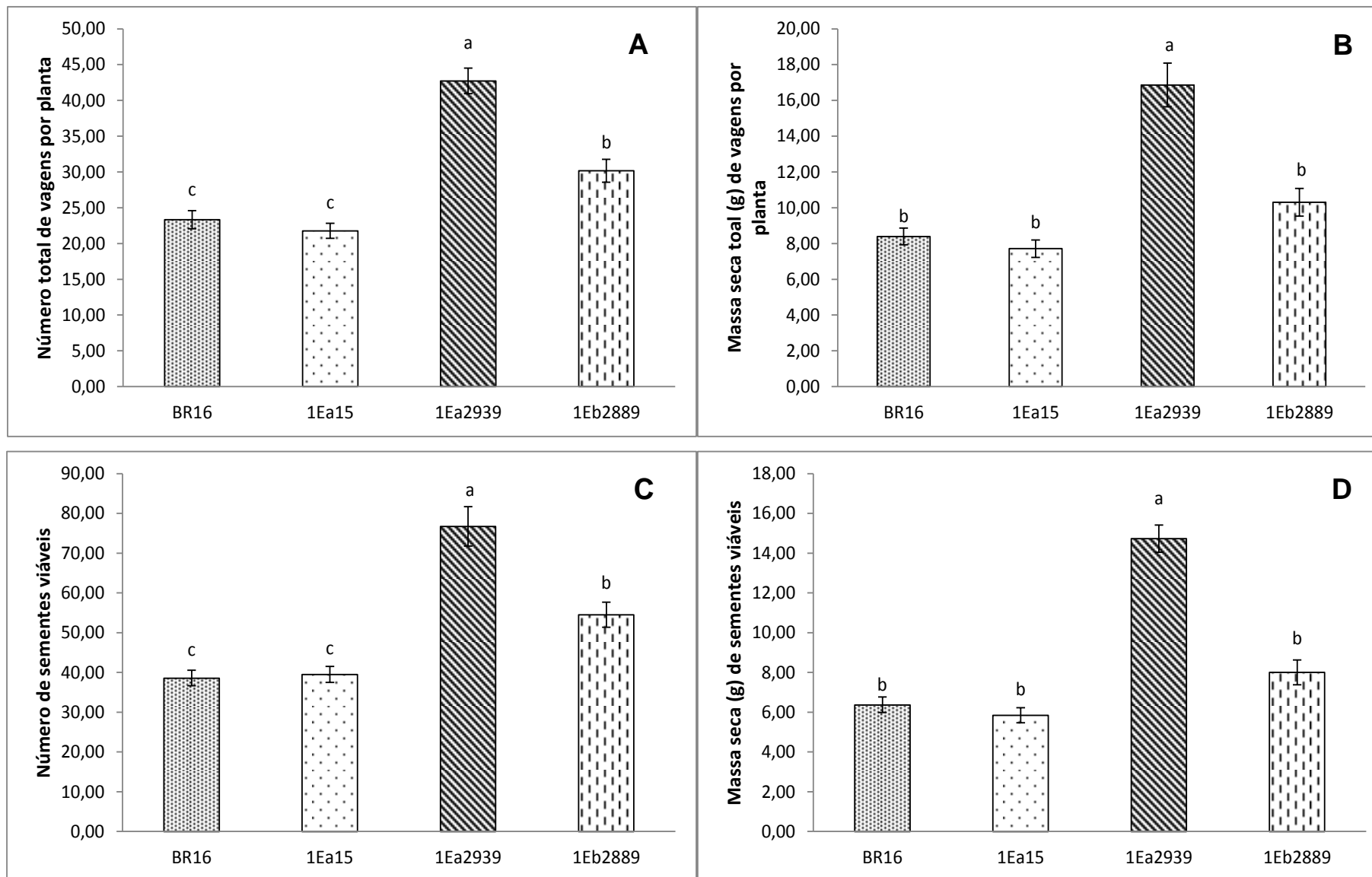


Fig. 12 Componentes de rendimento (por planta) de linhagens *AtAREB* geneticamente modificadas para tolerância à seca e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16). a) número total de vagens. b) massa seca total de vagens. c) número de sementes viáveis. d) massa seca de sementes viáveis. Valores representam médias \pm erro padrão; n=9 plantas. Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$).

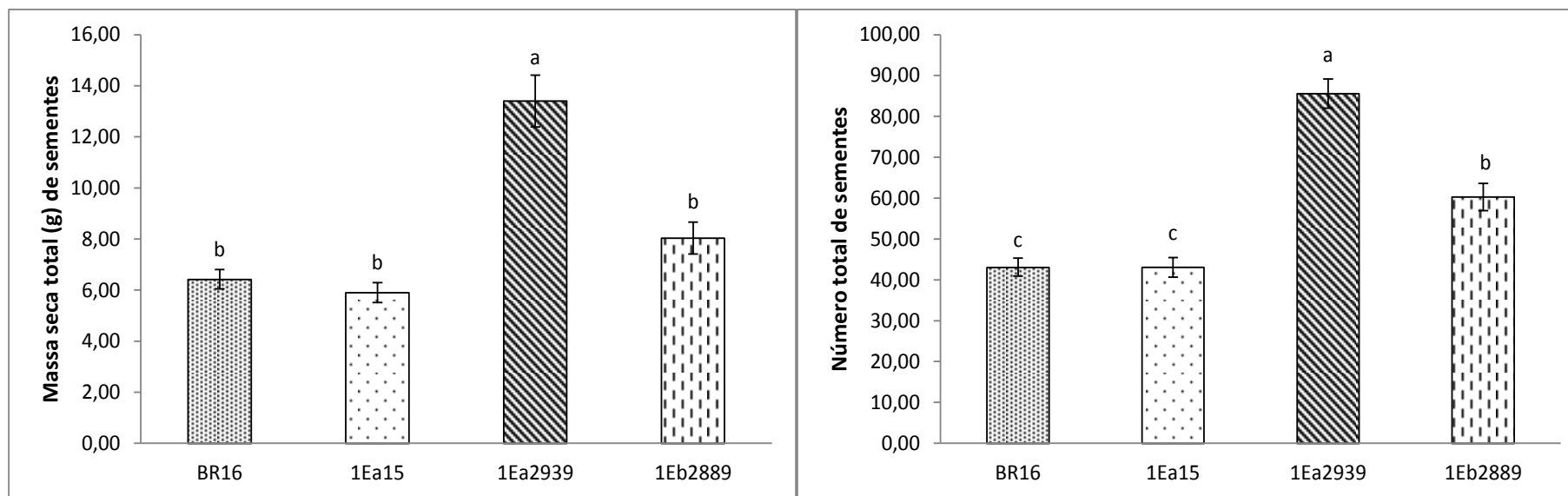


Fig. 13 Componentes de rendimento (por planta) de linhagens *AtAREB* geneticamente modificadas para tolerância à seca e sua isolinha a cultivar sensível à seca (BR 16). e) massa seca de sementes inviáveis; f) número total de sementes; g) número total de sementes inviáveis; h). Valores representam médias \pm erro padrão; $n=9$ plantas. Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$).

CONCLUSÕES

- ✓ Expressão do *AtAREB1* sob controle do promotor CaMV 35 em plantas de soja não resultou em retardo no crescimento, uma vez que as plantas transformadas não diferiram significativamente da cultivar BR 16 em relação a: matéria seca do sistema radicular, matéria seca das folhas (exceto evento 1Eb2889) e área foliar;
- ✓ Expressão do *AtAREB1* sob controle do promotor CaMV 35 em plantas de soja resultou em maiores taxas de sobrevivência das plantas transformadas após déficit hídrico e re-irrigação;
- ✓ O desempenho vegetativo agrônômico dos eventos 1Ea2939 e 1Eb2889 em relação às plantas BR 16 e evento 1Ea15 pode estar relacionada com o uso conservativo de água em situação de boa disponibilidade hídrica com conseqüente armazenamento de água para uso posterior;
- ✓ Expressão do *AtAREB1* sob controle do promotor CaMV 35 resultou em plantas com maior número total de vagens, maior massa seca total de vagens, maior número de sementes viáveis, maior massa seca de sementes viáveis, maior massa seca total de sementes e maior número total de sementes por planta;
- ✓ Sugere-se que expressão do *AtAREB1* conferiu às plantas transformadas mecanismos de evitamento à seca por meio de redução na *gs* e transpiração foliar quando em condições de boa disponibilidade hídrica.

Considerações finais e perspectivas futuras

Tendo em vista o complexo mecanismo na resposta ao déficit hídrico, pretende-se dar continuidade aos trabalhos nos quais novos estudos serão realizados a fim de se determinar a expressão de outros genes responsivos ao déficit hídrico, principalmente nos eventos transgênicos de melhor sobrevivência. A compreensão de como o gene *AtAREB* inserido na soja atua pode ser realizado pelo estudo da expressão em plantas superexpressando o mesmo. Entre as técnicas desta análise estão a de RNAseq e PCR quantitativo, que analisam e quantificam, respectivamente, a expressão gênica. Desta forma, o estudo da cascata completa, juntamente com análises fisiológicas, agrônomicas e bioquímicas, poderão elucidar a maneira como o transgene *AtAREB1* aumenta a tolerância/evitamento ao déficit hídrico em plantas de soja geneticamente modificadas. Pode-se sugerir que é importante verificar a hipótese na qual uma resposta diferencial frente à elevação da temperatura em condições controle pode conferir resposta diferencial em relação ao estresse hídrico e assim conferir vantagens aclimatativas em condições de seca.

A partir dos dados gerados no presente estudo, pretende-se determinar qual o mecanismo usado pelo evento 1Ea2939 para melhor performance sob déficit hídrico. De acordo com Passioura (2012), os resultados obtidos em condições controladas podem não relacionar com o comportamento das plantas em condições de campo. Então é também importante testar este evento em condições reais de campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.L. Overexpression of the ABA-Dependent AREB1 Transcription Factor from *Arabidopsis thaliana* Improves Soybean Tolerance to Water Deficit. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.31, p.719–730, 2012.

BAUER, H.; ACHE, P.; LAUTNER, S.; FROMM, J.; HARTUNG, W.; AL-RASHEID, K.A.S.; SONNEWALD, S.; SONNEWALD, U.; KNEITZ, S.; LACHMANN, N.; MENDEL, R.R.; BITTNER, F.; HETHERINGTON, A.M.; HEDRICH, R. The Stomatal Response to Reduced Relative Humidity Requires Guard Cell-Autonomous ABA Synthesis. **Current Biology**, v.23, p.53-57, 2013.

BHATNAGAR-MATHUR, P.; DEVI, M.J.; REDDY, D.S.; LAVANYA, M.; VADEZ, V.; SERRAJ, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHARMA, K.K.; Stress inducible expression of *AtDREB1A* in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) increases transpiration efficiency under water limiting conditions. **Plant Cell Reporter**, v.26, p.2071–2082, 2007.

BOTA, J.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress. **New Phytologist**, v.162, p.671–681, 2004.

CHAKRABORTEE, S.; BOSCHETTI, C.; WALTON, L.J.; SARKAR, S.; RUBINSZTEIN, D.C.; TUNNACLIFFE, A. Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. **PNAS**, v.104, p.18073–18078, 2007.

EGLI, D.B. The Relationship between the Number of Nodes and Pods in Soybean Communities. **Crop Science**, v.53, n.4, p.1668-1676, 2013.

ENNAHLI, S.; EARL, H.J. Physiological limitations to photosynthetic carbon assimilation in cotton under water stress. **Crop Science**, v.45, p.2374–2382, 2005.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E.; BURMOOD, D.T.; PENNINGTON, J.S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, Madison, v.11, n.6, p.929-931, 1971.

FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitation revisited. **Annals Botany**, v.89, v.183–189, 2002.

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.

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*. **Plant Molecular Biology**, v. 17, p.3470-3488, 2005.

FUJITA, Y.; NAKASHIMA, K.; YOSHIDA, T.; KATAGIRI, T.; KIDOKORO, S.; KANAMORI, N.; UMEZAWA, T.; FUJITA, M.; MARUYAMA, K.; ISHIYAMA, K.; KOBAYASHI, M.; NAKASONE, S.; YAMADA K.; ITO, T.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. **Plant Cell Physiology**, v.50, p.2123-2132, 2009.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of Plant Research**, v.124, p.509–525, 2011.

GAO, S.; CHEN, M.; XU, Z.; ZHAO, C.; LI, L.; XU, H.; TANG, Y.; ZHAO, X.; MA, Y. The soybean GmbZIP1 transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, v.75, p.537–553, 2011.

HEATHERLY, L. G. & ELMORE, T. W. Managing inputs for peak production. In Soybeans: Improvement, Production and Uses. Edited by Specht, J. E. e Boerma, H. R. p.451-536. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, 2004.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **Calif. Agr. Expt. Sta. Circ.** 347, 1950.

HSIEH, T.H.; LEE, J.T.; CHARNG, Y.Y.; CHAN, M.T. Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. **Plant Physiology**, v.130, p.618–626, 2002a.

HSIEH, T.H.; LEE, J.T.; YANG, P.T.; CHIU, L.H.; CHARNG, Y.Y.; WANG, Y.C.; CHAN, M.T. Heterology expression of the Arabidopsis C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. **Plant Physiology**, v.129, p.1086–1094, 2002b.

HUFSTETLER, E.V.; BOERMA, H.R.; JR CARTER, T.E.; EARL, H.J. Genotypic Variation for Three Physiological Traits Affecting Drought Tolerance in Soybean. **Crop Science**, v.47, p.27-35, 2007.

IUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; TAJI, T.; NARAMOTO, M.; SEKI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; KAKUBARI, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v.27, p.325-333, 2001.

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, J.S.; MIZOI, J.; YOSHIDA, T. et al. An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the DREB2A gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in Arabidopsis. **Plant Cell Physiology**, v.52, p.2136–2146, 2011.

KOBAYASHI, F.; MAETA, E.; TERASHIMA, A.; TAKUMI, S. Positive role of a wheat HvABI5 ortholog in abiotic stress response of seedlings. **Physiol Plant**, v.134, p74–86, 2008.

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

LAWLOR, D.W. Genetic Engineering to improve plant performance under drought: Physiological evaluation of achievements, limitations and possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p.695–709, 2013.

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.

MARCOLINO-GOMES, J.; RODRIGUES, F.A.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; BENDIX, C.; NAKAYAMA, T.J.; CELAYA, B.; MOLINARI, H.B.C.; OLIVEIRA,

M.C.N.; HARMON, F.G.; NEPOMUCENO, A.L. Diurnal Oscillations of Soybean Circadian Clock and Drought Responsive Genes. **Plos ONE**, v.9, 2014.

MELCHER, K.; NG, L. M.; ZHOU, X. E.; SOON, F. F.; XU, Y.; SUINO-POWELL, K. M.; PARK, S. Y.; WEINER, J. J.; FUJII, H.; CHINNUSAMY, V.; KOVACH, A.; LI, J.; WANG, Y.; LI, J.; PETERSON, F. C.; JENSEN, D. R.; YONG, E. L.; VOLKMAN, B. F.; CUTLER, S. R.; ZHU, J. K.; XU, H. E. A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. **Nature**, v.462, p.602–608, 2009.

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, 2011.

RAY, J.D.; SINCLAIR, T.R. The effect of pot size on growth and transpiration of maize and soybean during water deficit stress. **Journal of Experimental Botany**, v.49, p.1381–1386, 1998.

REEVES, W.M.; LYNCH, T.J.; MOBIN, R.; FINKELSTEIN, R.R. Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive (ABI) 4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors. **Plant Molecular Biology**, 75:347–363, 2011.

SALINET, L.H. Avaliação fisiológica e agrônômica de soja geneticamente modificada para maior tolerância à seca. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2009. P.32, Dissertação (Mestrado em Ciências).

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.; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C. Identification of reference genes for expression analysis by real-time quantitative PCR in drought-stressed soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.58–65. 2011.

TEZARA, W.; MITCHELL, V.J.; DRISCOLL, S.D.; LAWLOR, D.W. Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1781–1791, 2002.

TUBEROSA, R. Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. **Frontiers in Physiology**, v.3, p.1-26, 2012.

UMEZAWA, T.; SUGIYAMA, N.; MIZOGUCHI, M.; HAYASHI, S.; MYOUGA, F.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; ISHIHAMA, Y.; HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.106, p.17588–17593, 2009.

UMEZAWA, T.; NAKASHIMA, K.; MIYAKAWA, T.; KUROMORI, T.; TANOKURA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport. **Plant Cell Physiology**. v.51, p.1821-1839, 2010.

VADEZ, V., SINCLAIR, T.R. Leaf ureide degradation and N₂ fixation tolerance to water deficit in soybean. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.153–159, 2001.

VRANOVÁ, E, LANGEBARTELS, C.; MONTAGU, M.V.; CAMP, W.V. Oxidative stress, heat shock and drought differentially affect expression of a tobacco protein phosphatase 2 C. **Journal of Experimental Botany**, v.51, p.1763-1764, 2000.

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

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.

ANEXOS

Tabela 1. Sequência do *primer* usado na reação de PCR convencional e tamanho esperado dos fragmentos amplificados.

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)
Areb1-7	F AGAAGAAAATCTTCGTCAACAT R TAACAACATCATCCATGTTTCATT	639

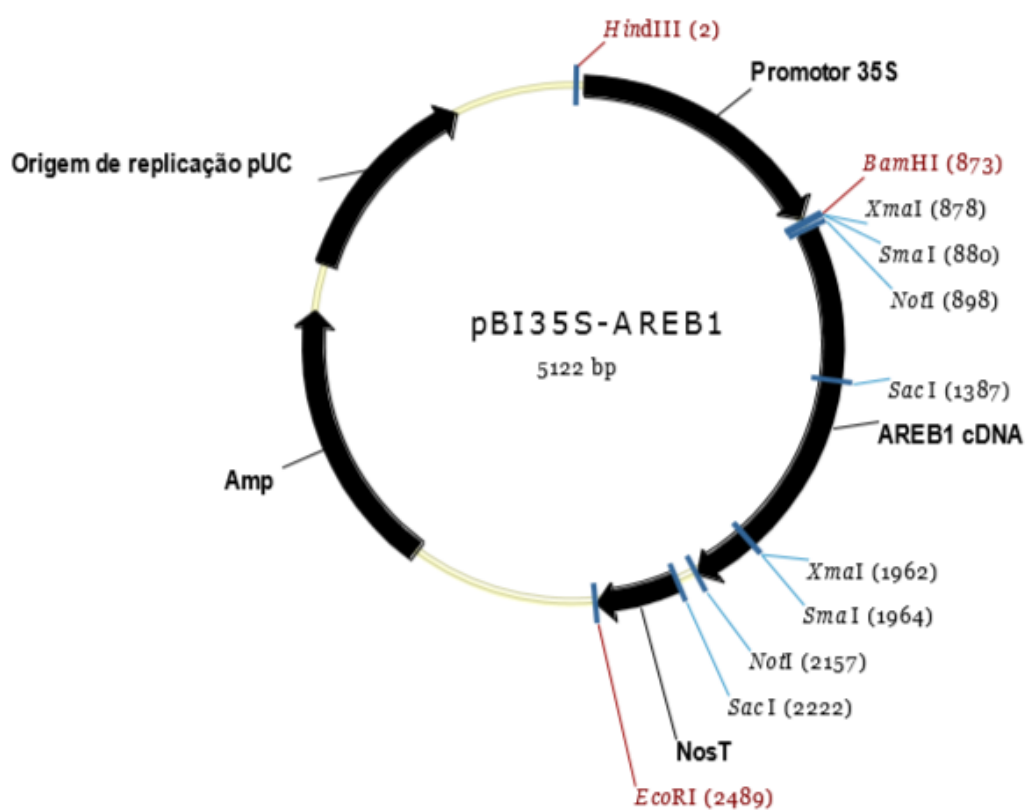


Fig. 1 Mapa de restrição do plasmídeo pBI221 com o inserto utilizado para transformação via biobalística (promotor 35S + AREB1 + terminador NosT): pBI35SΩ:AtAREB1 ou 35S:AREB1.

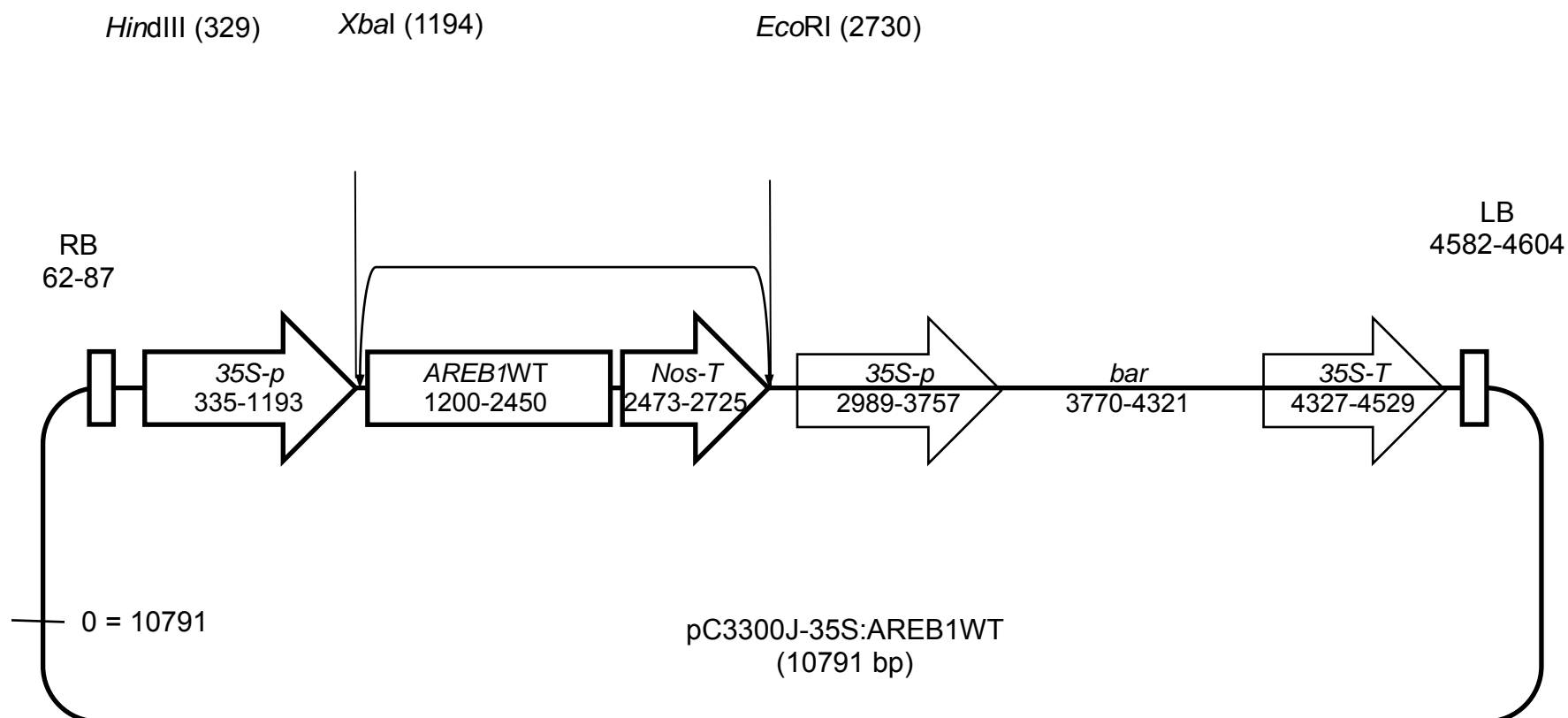


Fig. 2 Mapa de restrição do plasmídeo pC3300J com o inserto utilizado na transformação via *Agrobacterium tumefaciens* (promotor 35S + AREB1 + terminador NosT): pC3300J35SΩ:AtAREB1 ou 35S:AREB1.

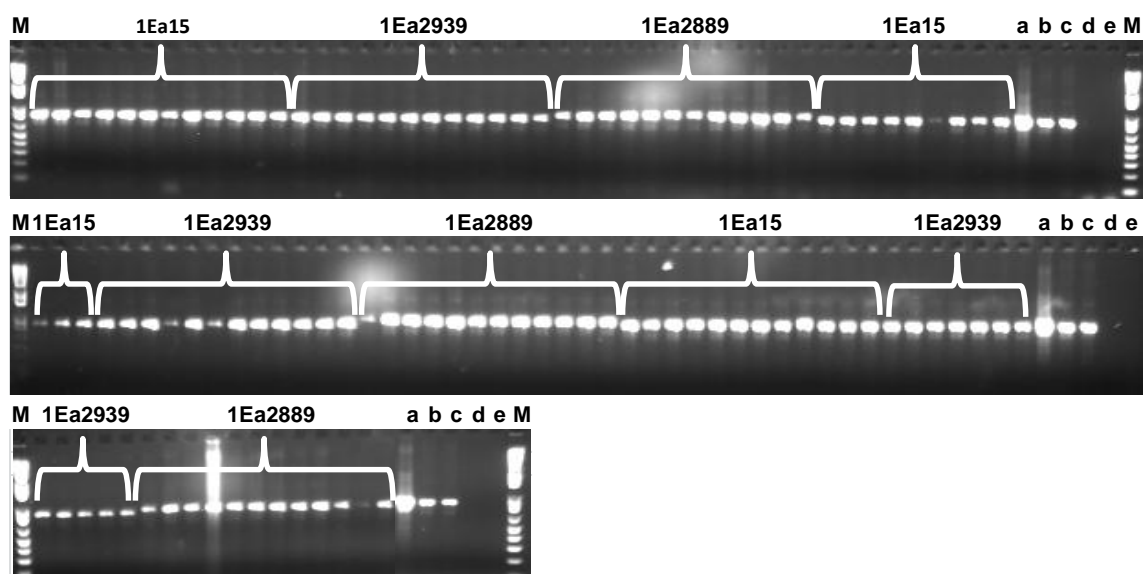


Fig. 3 Plantas positivas para o transgene alvo *AtAREB1*. Todas a plantas T_3 dos eventos 1Ea15, 1Ea2939 e 1Eb2889, utilizados para o experimento de análise dos genes da cascata de *AtAREB1* foram positivas para o transgene inserido. M: Marcador molecular 1kb plus, a: corresponde ao controle positivo (plasmídeo com a construção de *AtAREB1*), b: controle positivo (planta com *AtAREB1*), c: controle positivo (planta com *AtAREB1*), d: controle negativo BR 16, e: branco. Nesta figura os fragmentos foram amplificados utilizando o conjunto de iniciador 7 que amplifica um fragmento de 639 pb.

Tabela 2. Identificação e sequências de iniciadores utilizados na análise de expressão.

Gene	Gene de <i>Arabidopsis</i>	Gene ortólogo de soja	Nome em soja	Sequência Iniciadores (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)
35S- <i>AtAreb1</i>	-	-	-	F GGAGGTGGAGGGTTGACTAGA R CACTGCTCTGAAACTCATCAAACG	155
<i>Gmβ-Actina</i>	-	-	-	F GAGCTATGAATTGCCTGATGG R CGTTTCATGAATTCCAGTAGC	118
<i>PP2C</i>	AT1G07160	Glyma14g37480	GmPP2C	F GCTATGTTGATTTATGCCGTGGTG R ACTTTGGTCTCAGGCTCTGCTGTCA	115
SnRK2	AT4G33950	Glyma02g15330	GmSnRK	F CAAAGTGATCTCATGGATGGGA R TGCTATCTAAGTCAAGGTCAGGATC	205
RAB18	AT5G66400	Glyma09g31740	GmRAB18	F CAACTGGTGGCACTGGTTATGG R TGGTCATGCTGACGATGTTCT	103

Tabela 3. Sequência do *primer* β-actina íntron usado na reação de PCR convencional para verificar a eficiência do tratamento com DNase e síntese de cDNA.

Primers	Sequência (5'-3')	Fragmento amplificado no transcrito (pb)	Fragmento amplificado no DNA genômico (pb)
β -actina íntron	FCCCCTCAACCCAAAGGTCAACAG RGAATCTCTCTGCCCAATTGTG	442	523

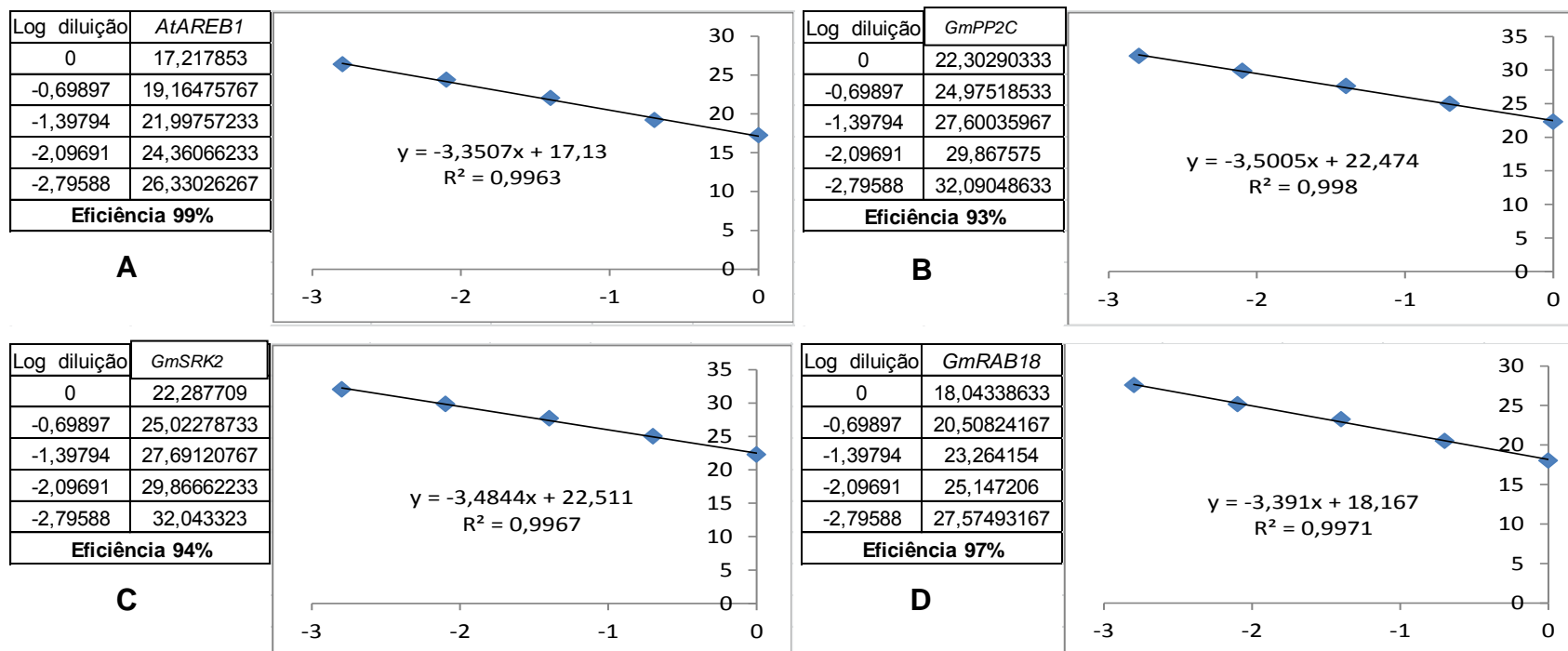


Fig. 4 Determinação da eficiência do sistema *Sybr green* para os genes alvos. Um bulk de amostras foi diluído serialmente 5x e as diferentes diluições foram amplificadas em sistema *Sybr green* para os genes alvos e o endógeno. Os valores de Ct foram plotados em função do logaritmo da diluição. O eixo y corresponde aos valores de Ct e eixo x log da diluição. **A)** Eficiência do gene *AtAREB1* com *slope* = -3,3507. **B)** Eficiência do gene *GmPP2C* com *slope* = 3,5005. **C)** Eficiência do gene *GmSRK2* com *slope* = 3,4844. **D)** Eficiência do gene *GmRAB18* com *slope* = 3,301.

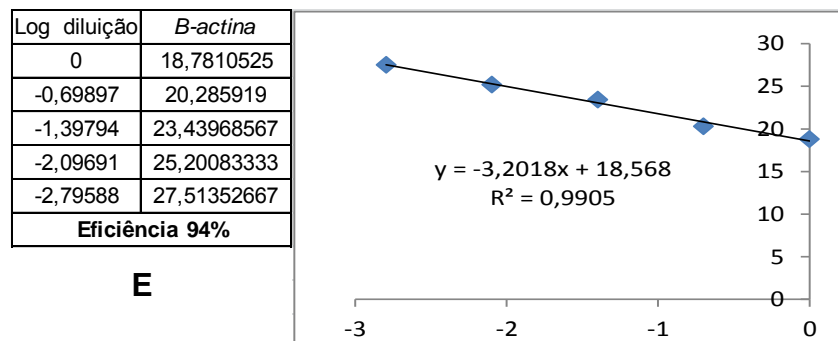


Fig. 5 Determinação da eficiência do sistema *Sybr green* para os alvos. Um bulk de amostras foi diluído serialmente 5x e as diferentes diluições foram amplificadas em sistema *Sybr green* para os alvos e o endógeno. Os valores de Ct foram plotados em função do logaritmo da diluição. O eixo y corresponde aos valores de Ct e eixo x log da diluição. **E)** Eficiência do gene de referência endógena *Gmβ-actina* com *slope* = 3,2018.

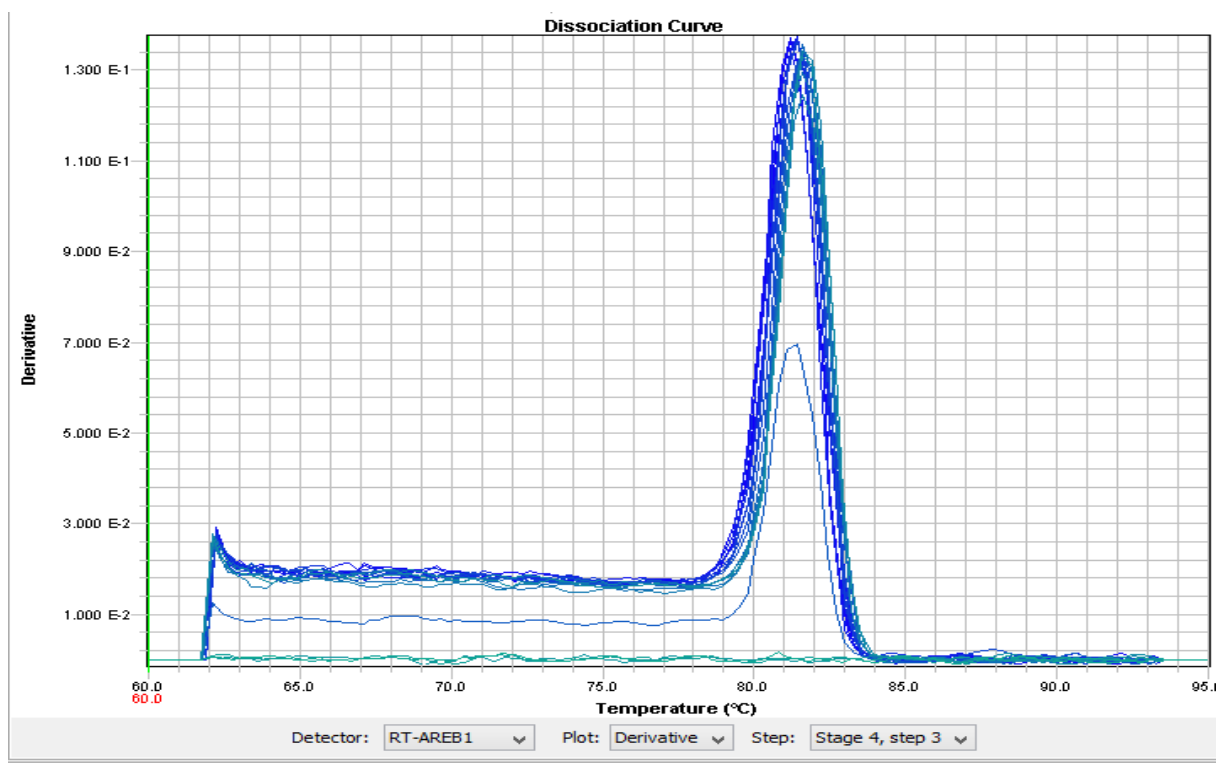


Fig. 6 Curva de dissociação da reação de eficiência do *primer* de *AtAREB1* usado na quantificação relativa dos transgenes por RT-qPCR.

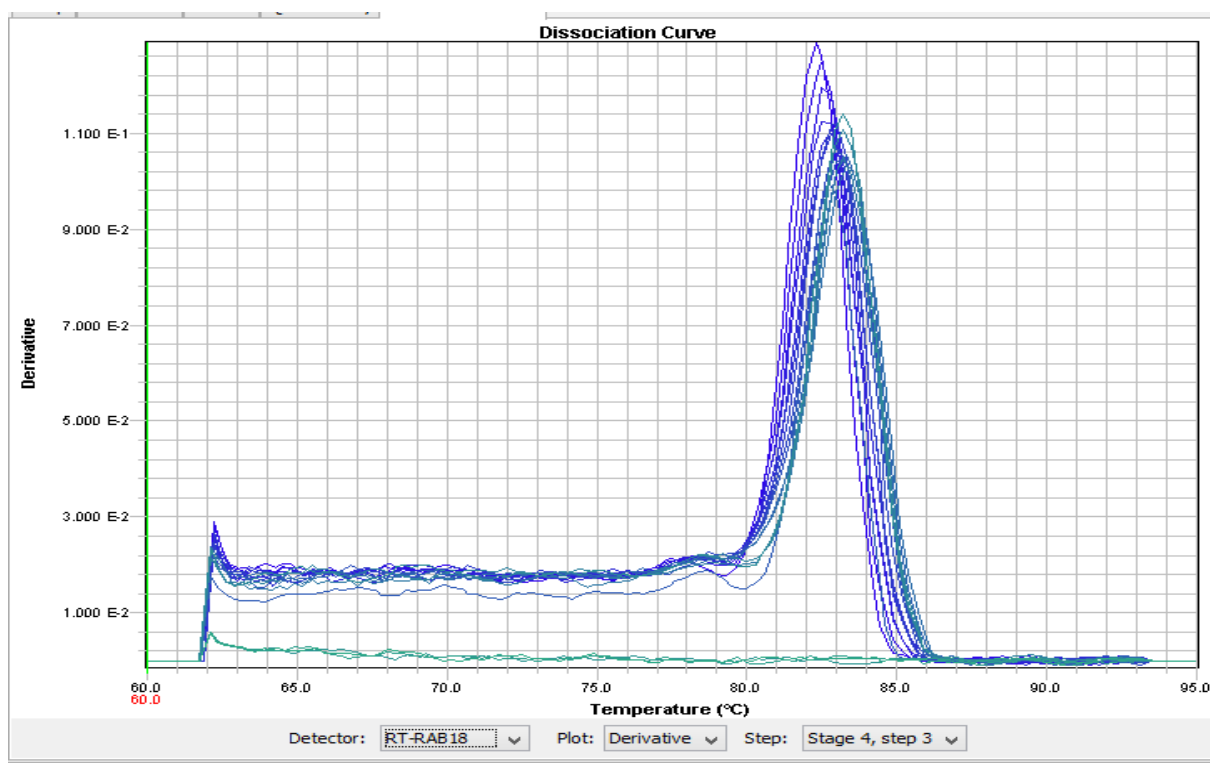


Fig. 7 Curva de dissociação da reação de eficiência do *primer* de *GmRAB18* usado na quantificação relativa dos transgenes por RT-qPCR.

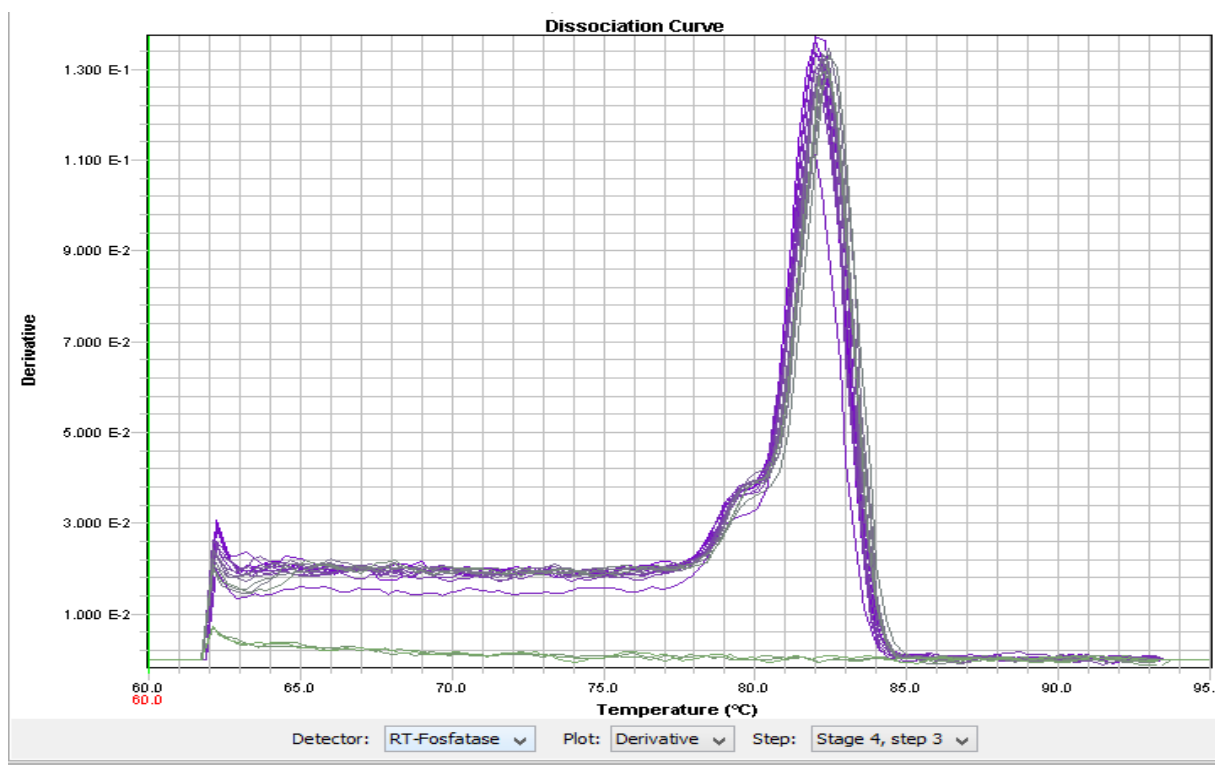


Fig. 8 Curva de dissociação da reação de eficiência do *primer* de *PP2C* usado na quantificação relativa dos transgenes por RT-qPCR.

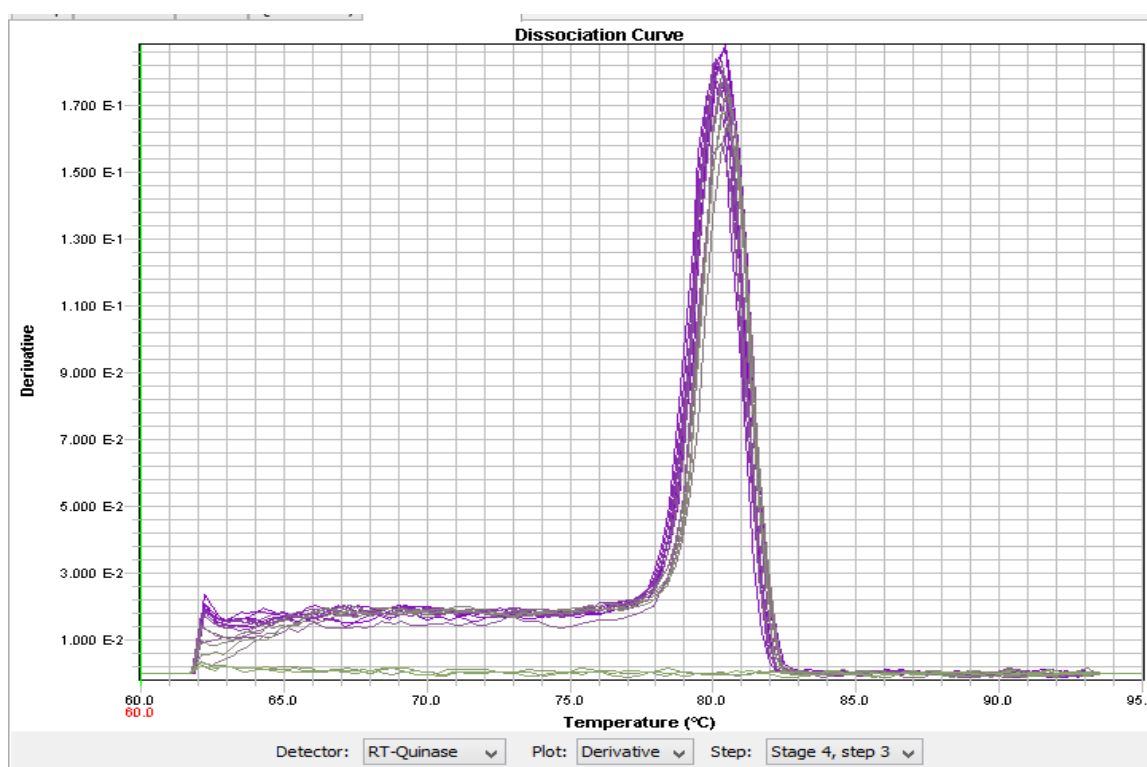


Fig. 9 Curva de dissociação da reação de eficiência do *primer* de *SRK2* usado na quantificação relativa dos transgenes por RT-qPCR.