

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**DESENVOLVIMENTO DE SOJA TOLERANTE À SECA E AVALIAÇÃO
PRELIMINAR DE BIOSSEGURANÇA ALIMENTAR DA PROTEÍNA AtDREB1A**

Tese de doutorado

Magda Aparecida Beneventi

Porto Alegre
Outubro 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**DESENVOLVIMENTO DE SOJA TOLERANTE À SECA E AVALIAÇÃO
PRELIMINAR DE BIOSSEGURANÇA ALIMENTAR DA PROTEÍNA A1DREB1A**

Magda Aparecida Beneventi

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadores:

**Dra. Maria Fátima Grossi de Sá
Dr. Alexandre Lima Nepomuceno**

Porto Alegre
Outubro 2010

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília-DF e no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja em Londrina- PR, sob a orientação da Dra. Maria Fátima Grossi de Sá e do Dr. Alexandre Lima Nepomuceno.

Os auxílios financeiros foram obtidos pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa Soja e *Japan International Research Center for Agricultural Sciences* (JIRCAS).

Banca Examinadora

Dr. Osmundo Brilhante de Oliveira Neto

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Fernanda Bered

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular
Instituto de Biociências, Departamento de Genética
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Márcia M. A. N. Pinheiro Margis

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
CBiot -Centro de Biotecnologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dedico este trabalho, à minha família e ao meu esposo Gustavo.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Agradecimentos

À Deus.

À Dra. Fátima Grossi, pela orientação, confiança e oportunidades.

Ao Dr. Alexandre Nepomuceno, pelo apoio, orientação e amizade.

Ao Dr. Osmundo Brilhante e Dr. Thales Rocha pelos ensinamentos, amizade e companheirismo.

Ao Firmino e Erich pela colaboração e amizade.

Ao Dr. Luciano Paulino e Dr. Marcelo Bemquerer, pela colaboração.

À Lecir pela ajuda, amizade e incentivo.

Aos amigos e colegas do LIMPP e a todos aqueles que contribuíram para a realização desse trabalho.

ÍNDICE

I Lista de Abreviaturas	9
II Lista de Figuras e Tabelas	10
III Resumo	12
IV Abstract	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Soja	18
2.2. Mecanismos de Resposta ao Déficit Hídrico	21
2.2.1. Respostas Fisiológicas e Morfológicas	22
2.2.2. Respostas Moleculares	26
2.2.3. Fatores de Transcrição	32
2.3. <i>AtDREB1A</i>	34
2.4. Plantas Geneticamente Modificadas	38
2.5. Ferramentas de Análises para o Estudo da Resposta ao Estresse em Plantas	40
3. OBJETIVOS	44
4. FORMATO E ORGANIZAÇÃO DA TESE	45
Capítulo 1. Avaliação preliminar de biossegurança alimentar da proteína recombinante DREB1A/CBF3 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
Capítulo 2. Improving Drought Stress Tolerance in Soybean by Introgression of the <i>RD29A: AtDREB1A/CBF3</i> construct	83
Capítulo 3. Análise proteômica de soja GM (geneticamente modificada) e não GM submetida a déficit hídrico	118
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	143
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146
7. ANEXOS	158
Anexo I <i>Curriculum Vitae</i>	159
Anexo II Carta de encaminhamento do manuscrito	176

I LISTA DE ABREVIATURAS

aa – aminoácidos

Abs – absorvância

BSA – albumina de soro bovino

CHAPS – detergente não-iônico ou zwitteriônico

DTT – Dithiothreitol

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

g – gramas

h(s) – hora(s)

HZ – hertz

IPTG – Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

kDa – Kilo Daltons

kHz – quilohertz

KV – quilovolts

M – molaridade

Ma – miliamper

min – minutos

Mm – milimolar

ng – nanogramas

nm – nanômetros

OD – densidade óptica

OHMS – unidade de resistência elétrica

PMSF – Fenilmetilsulfonil fluoreto

p/v – peso por volume

RPM – rotação por minuto

SDS – “Sodium Dodecyl Sulphate”

seg – segundos

SOC – “Super Optimal broth with Catabolite repression”

TBS – Tris-buffered Saline

V – volt(s)

v/v – volume volume

W – watt

2-DE – eletroforese bidimensional

II LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Capítulo 1

- Figura 1.** Mapa do vetor pET101/DREB1A utilizado para a expressão heteróloga em *E. coli*. **51**
- Figura 2.** A- Gel SDS-PAGE 12%. Expressão e purificação da proteína DREB1A. B- Western blot usando o anticorpo monoclonal conjugado Anti-HIS. **58**
- Figura 3.** Estrutura tridimensional da proteína carioferina de humanos Beta2TRANSPORTIN, visualizada no programa *PyMOL 1.2*. **61**
- Figura 4.** Predição de alergenicidade da proteína DREB1A, utilizando o critério da FAO/WHO >35% de identidade e uma janela de leitura de 80 aminoácidos, no *AllergenOnline*. **63**
- Figura 5.** Predição de alergenicidade da proteína DREB1A no banco de dados *Allergen Database for Food Safety*. **64**
- Figura 6.** Alinhamento entre seqüências da proteína DREB1A e Ole e 9 utilizando o programa *ClustalW*. **65**
- Figura 7.** Sequências de aminoácidos presentes nos epítomos da proteína Ole e 9. **66**
- Figura 8.** Busca por sítios de N-glicosilação na proteína DREB1A no banco de dados *Allergen Database for Food Safety*. **67**
- Figura 9.** Imagens em 2D e 3D (125x125µm) de eritrócitos humano por microscopia de força atômica. **70**
- Figura 10.** Parâmetros 1D, 2D e 3D da morfologia de eritrócitos avaliados por microscopia de força atômica. **71**
- Tabela 1.** Análise comparativa dos resultados de similaridade entre a proteína DREB1A e seqüências de aminoácidos de proteínas antinutricionais, tóxicas e/ou alergênicas, disponíveis em diferentes bancos de dados. **60**
- Tabela 2.** Atividade hemolítica da proteína DREB1A em diferentes concentrações. A concentração é dada em relação a 10% de pureza da proteína DREB1A presente no produto de semipurificação. **68**

Capítulo 2

Figura 1.	Construction of <i>RD29A:DREB1A</i> and <i>RD29A:GUS</i> used for soybean-embryo transformation.	88
Figura 2.	Histochemical GUS assay.	91
Figura 3.	Southern blot analysis.	92
Figura 4.	<i>AtDREB1A</i> expression in soybean.	94
Figura 5.	Physiological parameters in P58 line at T ₂ generation plants under water stress.	95
Figura 6.	Soybean drought activated genes by <i>AtDREB1A</i> .	97
Figura 7.	Anatomical evaluation of soybean leaflets under drought-stress treatment.	98
Figura 8.	Agronomical parameters in P58 line under water stress	99
Figura 9.	P58 line containing the <i>RD29A: AtDREB1A</i> construct and the non-transgenic isoline BR16.	100
Tabela 1.	PCR primers.	89
Tabela 2.	Lines containing <i>RD29A:DREB1A</i> construct.	89
Tabela 3.	Segregation analysis on lines containing the <i>RD29A:AtDREB1A</i> construct.	90

Capítulo 3

Figura 1.	Montagem do experimento de hidroponia em casa de vegetação.	124
Figura 2.	Coleta do material sob tratamento de déficit hídrico.	125
Figura 3.	Modelo esquemático do método de extração utilizado. Modelo proposto por Shen (2002) e modificado por Mesquita e colaboradores (2009).	127
Figura 4.	Eletroforese unidimensional de proteínas da cultivar de soja BR16 não GM e BR16(P58) GM.	130
Figura 5.	Análise 2-DE de folhas de soja BR16 não GM (T0).	132
Figura 6.	Análise 2-DE de folhas de soja BR16 não GM (T90).	133
Figura 7.	Análise 2-DE de folhas de soja P58 GM (T0).	134
Figura 8.	Análise 2-DE de folhas de soja P58 GM (T90).	135

III RESUMO

Um dos grandes desafios da pesquisa agrícola atual é desenvolver estratégias para obtenção de plantas mais tolerantes, portanto, continuar ampliando o conhecimento sobre os mecanismos pelos quais as plantas respondem à seca, é essencial para a identificação de rotas metabólicas envolvidas no processo de defesa e o desenvolvimento de genótipos cada vez mais adaptados. Neste trabalho, para a obtenção de plantas de soja tolerantes à seca, a construção *RD29A:AtDREB1A* a qual confere tolerância ao déficit hídrico foi inserida em cultivares de soja e a biossegurança alimentar da proteína DREB1A/CBF3 de *A. thaliana* foi avaliada. Também, os extratos protéicos das plantas submetidas ao estresse hídrico foram comparados para a identificação de proteínas de soja diferencialmente expressas que podem estar envolvidas nas respostas à seca. A avaliação de biossegurança alimentar da proteína *AtDREB1A in silico* mostrou que a proteína não possui características de toxicidade, alergenicidade, antinutricionais, ou sítios de N-glicosilação, assim como, de atividade hemolítica sob eritrócitos de humanos atestado com a proteína *AtDREB1A* produzida *in vitro*, indicando ausência de efeitos adversos. A inserção da construção *RD29A:AtDREB1A* e *RD29A:GUS* em soja, demonstrou que o promotor *RD29A* e o fator de transcrição *AtDREB1A* de *A. thaliana* são ativados aumentando a tolerância ao déficit hídrico em soja. Vinte linhagens transgênicas foram obtidas por biobalística e apresentaram estabilidade do transgene. Análises histoquímicas confirmaram a indução do promotor *RD29A* em condições de desidratação e o aumento de expressão de genes de soja *GmPip1* *GmGols* regulados pela proteína DREB1A também foi confirmado por RT-qPCR. Diferenças anatômicas significativas não foram observadas. Em média, os parâmetros fisiológicos foram superiores nas linhagens transgênicas, quando comparadas à sua isolinha BR16. Embora características agrônômicas mais adaptativas relacionadas à produção não foram evidentes em casa de vegetação, há uma boa indicação de que a estratégia pode melhorar a tolerância à seca em plantas de soja. Para isso, experimentos a campo já estão sendo conduzidos para uma melhor caracterização agrônômica e fisiológica. Na busca por ampliar os conhecimentos sobre os eventos envolvidos nas respostas à seca, a comparação dos extratos protéicos de soja BR16 não transgênica e BR16(P58) geneticamente modificada (GM) com a construção *RD29A:AtDREB1A* em condições controle e sob déficit hídrico, possibilitou a identificação de “spots” comuns aos dois tratamentos assim como de “spots” diferencialmente expressos, através da metodologia de 2-DE. Nos tratamentos de déficit hídrico, 25 “spots” foram identificados em BR16 não GM e 34 “spots” em P58 GM, entretanto, análises de espectrometria de massa ainda estão em andamento e pesquisas em bancos dados serão fundamentais para a identificação das proteínas diferencialmente expressas em resposta ao déficit hídrico.

IV ABSTRACT

One of the challenges in agriculture is to develop strategies to obtain plants with higher drought tolerance. Therefore, the identification of metabolic pathways and understanding of the mechanisms by which plants respond to drought is an essential tool for the development of more adapted genotypes. In this work, the *RD29A:AtDREB1A* genetic construct which was reported to confer water deficit tolerance was inserted into soybean cultivars, and the food safety of *Arabidopsis thaliana* AtDREB1A/CBF3 protein was evaluated. Also, protein extracts from soybean plants submitted to water stress conditions were compared to identify differentially expressed soybean proteins involved in drought responses. The *in silico* evaluation of AtDREB1A protein showed that the protein has no evidence of toxicity, allergenicity, antinutritional features or N-glycosylation sites. No hemolytic activity on human erythrocytes assayed *in vitro* with AtDREB1A protein was detected, indicating no adverse effects. The insertion of *RD29A:AtDREB1A* and *RD29A:GUS* constructs in soybean showed that the *RD29A* stress-inducible promoter and the AtDREB1A transcription factor were activated and improved drought tolerance in soybean. Using bioballistic transformation, we obtained twenty stably transformed soybean lines. Histochemical analysis confirmed the induction of the *RD29A* promoter under dehydration conditions and increased expression of two soybean genes activated by AtDREB1A *GmPip1* and *GmGols* were confirmed by RT-qPCR. No anatomical differences were observed. On average, physiological parameters were superior in the transgenic line BR16(P58) when compared to the isolate BR16. Although agronomic traits related to higher adaptive production were not evident in greenhouse, there is a good indication that the strategy can improve drought tolerance in soybean. To establish trait efficacy, field experiments are already being conducted to obtain relevant agronomic and physiological data. To better understand the molecular events involved in drought responses, a comparison using protein extracts from genetically modified (GM) BR16(P58) and non-GM soybean BR16 in watered control conditions and under water deficit treatment allowed the identification of common proteins to both treatments as well as of proteins that are differentially expressed between treatments using 2-dimension gel electrophoresis (2-DE). In the water deficit treatment 25 differentially expressed protein spots were identified in non-GM isolate BR16 and 34 spots in BR16(P58). Subsequent analysis of these spots using mass spectrometry is still being conducted and peptide information in available public databases will be essential for identification of differentially expressed proteins.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos 100 anos a temperatura média global aumentou cerca de 0,6°C e projeções indicam que a temperatura ainda continuará a subir (ROOT *et al.*, 2003). O Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) prevê que a produção de alimentos em todo o mundo poderá sofrer um impacto negativo nas próximas décadas, devido às mudanças climáticas provocadas pelo aquecimento global e, segundo os cientistas, o aumento da temperatura ameaça a produção agrícola podendo desta forma agravar o problema da fome já atual. Países pobres da África e da Ásia seriam os mais afetados, mas grandes produtores agrícolas, como o Brasil, também sentiriam os efeitos já na próxima década (BATES *et al.*, 2008; ASSAD & PINTO, 2008; WEMA, 2010).

Em estudo desenvolvido por pesquisadores da Embrapa e da Unicamp é previsto que o aumento da temperatura no país irá diminuir a área favorável aos cultivos de soja, café, milho, arroz, feijão e algodão, podendo levar a um prejuízo de R\$ 7,4 bilhões no ano de 2020. Entre as culturas, a soja deve ser a mais afetada pela mudança do clima, com uma diminuição prevista de até 41% na área de baixo risco ao plantio do grão em todo o país em 2070, gerando prejuízos de R\$ 7,6 bilhões, o que equivalente à metade das perdas projetadas para a agricultura brasileira daqui a seis décadas, como resultado do aquecimento global (ASSAD & PINTO, 2008).

A produção de soja está entre as atividades econômicas que apresentou um dos mais expressivos crescimentos nas últimas décadas. Isto pode ser atribuído a diversos fatores, tais como: estruturação de um grande mercado internacional relacionado com o comércio de produtos do complexo soja,

consolidação da oleaginosa como importante fonte de proteína vegetal, especialmente para atender demandas crescentes dos setores ligados à produção de produtos de origem animal e maior desenvolvimento e oferta de tecnologias, viabilizando a expansão e a exploração da cultura (EMBRAPA, 2008; DALL'AGNOL *et al.*, 2010). As lavouras de soja levaram progresso a pequenos municípios, tornaram-se o motor da economia de várias regiões e têm sido um dos maiores responsáveis pela expansão da receita cambial do país (MISSÃO, 2006).

Dada essa importância da cultura para o agronegócio nacional, e considerando o fato que a seca tem sido o principal responsável pelas oscilações anuais na produção brasileira de soja, os impactos climáticos previstos, como o aumento da temperatura global contribuirá negativamente para a produção da cultura, sendo uma área estratégica para o país a compreensão dos mecanismos de tolerância ao déficit hídrico e o desenvolvimento de novas variedades com maior tolerância a este estresse (FARIAS *et al.*, 1993; PITOL & BROCH, 2008; EMBRAPA, 2009).

Na busca por soluções que possam acelerar esse processo a engenharia genética tem sido uma alternativa eficiente na obtenção de plantas mais tolerantes a estresses (AGARWAL *et al.*, 2007). Como exemplo a inserção da construção *RD29A:AtDREB1A* em diferentes plantas mostrou que a super-expressão do fator de transcrição DREB1A induz o aumento transcricional de um conjunto de genes sob seu controle em resposta ao déficit hídrico, o que torna essa abordagem uma importante estratégia na obtenção de genótipos de soja mais tolerantes a seca (PELLEGRINESCHI *et al.*, 2002; OONO *et al.*, 2003; KASUGA *et al.*, 2004).

A adoção de culturas geneticamente modificadas e os benefícios trazidos por essas têm introduzido novas e promissoras características à agricultura na tentativa de solucionar ou amenizar os efeitos prejudiciais causados por fatores bióticos e abióticos (ISAAA, 2009). Nos últimos anos tem ocorrido um aumento no cultivo de transgênicos, e o Brasil suplantou a Argentina para tornar-se o segundo maior produtor com 5,6 milhões de novos hectares de culturas transgênicas (MARSHALL, 2010).

Parte desse aumento não está apenas relacionado aos benefícios por eles trazidos, mas deve-se a certificação de biossegurança que essas lavouras e produtos gerados vêm recebendo por diferentes órgãos de regulamentação em todo o mundo (OECD, 2007; JAMES, 2009). Diante de um histórico de uso seguro, o consumo de organismos geneticamente modificados (OGMs) tem sido desmistificado e a criação de abordagens que permitam investigar a biossegurança alimentar de novas proteínas que serão introduzidas em plantas agrícolas, garante que as pesquisas sejam focadas e comprometidas com os interesses da sociedade, desde o início de seu desenvolvimento (KUIPER *et al.*, 2001; CODEX ALIMENTARUS, 2009).

Portanto, para que todos esses progressos continuem acontecendo, no sentido de desenvolver cultivares que apresentem melhores respostas adaptativas às mudanças climáticas previstas, é necessário que a ciência agrícola avance cada vez mais na compreensão de respostas das plantas ao déficit hídrico, integrando pesquisas nas diversas áreas do conhecimento como genômica, transcriptoma e proteômica, buscando o entendimento das múltiplas vias de sinalização e respostas para o desenvolvimento de tecnologias mais

eficientes e competitivas em custos de produção e qualidade (STOLF, 2007; MESQUITA, 2010).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Soja

Originária da China, a soja (*Glycine Max* (L.) Merr.) pertencente à família das fabáceas (leguminosas) foi introduzida no Brasil via Estados Unidos, em 1882, (MISSÃO, 2006). Sua expansão, como cultura, ocorreu nos anos 70, com o interesse crescente da indústria de óleo e a demanda do mercado internacional. Esse crescimento se deveu, não apenas ao aumento da área cultivada (1,3 para 8,8 milhões de hectares), mas também, ao expressivo incremento da produtividade (1,14 para 1,73t/ha) graças às novas tecnologias disponibilizadas aos produtores pela pesquisa brasileira (EMBRAPA, 2004).

Atualmente, o Brasil configura-se como o segundo maior produtor mundial com uma produção recorde de 68,7 milhões de toneladas na safra de 2009/10 (CONAB, 2010), participando com cerca de 27,1% da produção mundial de soja em grão (USDA, 2009), atrás apenas dos Estados Unidos, cuja safra 2010/2011 está estimada em 91 milhões de toneladas (MPOG, 2010).

De acordo com o Censo Agropecuário 2006, na última década a cultura da soja foi a que mais se expandiu no Brasil, com um aumento de 88,8% na produção e tornou-se o principal grão do agronegócio nacional (IBGE, 2006). Somente de janeiro a junho de 2010 as exportações brasileiras do complexo formado por soja em grãos, óleo de soja bruto, óleo de soja refinado, farelo de soja e demais óleos e derivados do óleo renderam a balança do agronegócio cerca de 9,56 bilhões de dólares (CONAB, 2010).

Através da cultura da soja e toda a sua cadeia produtiva desenvolveu-se uma rede que gera empregos e pesquisas, impulsionando a economia no país e tendo como consequência o reconhecimento internacional pelo avanço

alcançado nas últimas décadas, gerando assim conhecimento e riquezas (BONATO & BONATO, 1987). Com essa cadeia produtiva, organizada e eficiente distribuída por todo o país, além de ser cultivada para alimentação humana e animal, o seu uso está sendo implementado com sucesso, de acordo com previsto pelo plano nacional de agroenergia, como uma das principais opções de matéria-prima na produção de biodiesel (MAPA, 2006).

Com o seu consumo mundial crescente, a soja entra na alimentação humana através da composição de vários produtos como embutidos, tofu, chocolates, e temperos para saladas, sendo a proteína, a base de ingredientes de padaria, cereais e bebidas, etc (MISSÃO, 2006). No entanto, seu uso mais conhecido, é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto. Outra grande aplicação está na indústria de adesivos e nutrientes, alimentação animal, adubos, formulador de espumas, fabricação de fibras e mais recentemente de biodiesel (EMBRAPA, 2010).

Por ser um alimento funcional, além de funções nutricionais básicas, a soja também produz efeitos benéficos à saúde, reduzindo os riscos de algumas doenças crônicas e degenerativas. Rica em proteínas de boa qualidade, possui ácidos graxos poliinsaturados e compostos fitoquímicos como: isoflavonas, saponinas, fitatos, dentre outros. Pesquisas têm demonstrado que as isoflavonas da soja reduzem os riscos de alguns tipos de câncer, como: mama, colo do útero e próstata (ESTEVEZ & MONTEIRO, 2001; MESSINA, 2004). Além de ser recomendada na tensão pré-mestrua, no alívio dos sintomas indesejáveis da menopausa e na prevenção da osteoporose, assim como, no controle de diabetes (MANDARINO *et al.*, 2003).

Apesar de todos aspectos positivos relacionados à cultura e do conhecimento gerado durante os anos de seu cultivo, resultante em elevado grau de tecnificação da maioria das lavouras e de pesquisas brasileiras, a disponibilidade hídrica continua como um fator limitante a obtenção de rendimentos mais próximos ao potencial produtivo da espécie, além de constituir-se na maior causa de variabilidade dos rendimentos de grãos observados de um ano para o outro nas diversas regiões produtoras do país (FARIAS *et al.*, 2006).

Para o seu completo desenvolvimento a planta de soja necessita de disponibilidade de água, principalmente, durante a germinação e no período entre floração e enchimento de grãos. Déficits hídricos expressivos durante essas fases provocam alterações fisiológicas e morfológicas nas plantas, como o fechamento estomático e enrolamento das folhas e, como conseqüência, causam a queda prematura de folhas e flores e abortamento das vagens, resultando, por fim, em redução na produtividade (EMBRAPA, 2009).

Nas safras de 1977/78 e 1978/79, os três estados do sul deixaram de colher cerca de 7,2 milhões de toneladas de grãos de soja devido às condições de seca (FARIAS *et al.*, 1993). Da mesma forma, durante duas safras consecutivas, 2003/04 e 2004/2005, o sul do país foi severamente afetado pelas escassezes de chuvas prolongadas, ocasionando perdas de aproximadamente 10,5 milhões de toneladas de soja somente no estado do Rio Grande do Sul. Em 2009, a redução de produtividade mais acentuada também se manifestou na produção de soja (2,9 milhões de toneladas) nos estados, do Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul devido à estiagem ocorrida nos dois últimos meses do ano.

Nesse contexto, o entendimento dos mecanismos de tolerância a seca e desenvolvimento de genótipos que possam suportar períodos mais longos de estiagem torna-se de fundamental importância para o melhoramento genético de plantas, visando auxiliar na redução das perdas ocasionadas por secas que constantemente tem afetado a cultura da soja no país (CASAGRANDE, 2001).

2.2. Mecanismos de Respostas ao Déficit Hídrico

O déficit hídrico pode ser definido como todo o conteúdo de água de um tecido ou célula que está abaixo do conteúdo de água mais alto exibido para a manutenção normal das funções biológicas que ocorrem no estado de total hidratação (TAIZ & ZEIGER, 2004). A água atua praticamente em todos os processos de uma planta, desempenhando um papel importante na manutenção e distribuição de calor, além de apresentar características funcionais de preenchimento, meio de transporte e solvente para reações celulares, permitindo que gases, minerais e outros solutos entrem nas células e movam-se por toda a planta (CAMPBELL, 1991; EMBRAPA, 2009).

Em defesa contra o déficit hídrico, as plantas podem desenvolver mecanismos tanto para retardar como para tolerar a desidratação, pela manutenção da hidratação do tecido, e pela capacidade de funcionar enquanto desidrata, respectivamente (TAIZ & ZEIGER, 2004). Mecanismos para retardar a desidratação pode ser resultado da diminuição da perda de água (causados como exemplo pelo fechamento estomático, desenvolvimento de tricomas, redução da área foliar e senescência de folhas velhas para diminuir a transpiração além de mudanças no tamanho, orientação e enrolamento das

folhas para minimizar a superfície exposta a luz, etc) ou maximização da absorção de água (aumento do crescimento radicular e mais profundo). Já os mecanismos de tolerância envolvem o ajustamento osmótico e eficiência na remoção de espécies reativas de oxigênio, formadas como uma consequência do metabolismo conturbado (WANG *et al.*, 2003; TAIZ & ZEIGER, 2004; BARNABÁS *et al.*, 2008).

Frente à falta de água, a resposta das plantas pode ser considerada um grupo de respostas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares simultâneas, visando aumentar sua tolerância ao estresse por alterações em seu metabolismo, crescimento e desenvolvimento (LAWLOR, 2002; MITTLER 2006; SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). Quando a regulação por meios dessas respostas é inadequada e o metabolismo não se ajusta para a manutenção das funções eventuais danos podem resultar na morte da planta (LAWLOR, 2002).

2.2.1. Respostas Fisiológicas e Morfológicas

Uma das primeiras respostas contra o déficit hídrico é o fechamento dos estômatos, reduzindo assim a condutância estomática para diminuir a perda de água, limitando a difusão de CO₂ para os cloroplastos (FREDERICK *et al.*, 1989). Duas razões principais podem causar o fechamento dos estômatos durante a seca: sinais hidráulicos (potencial de água na folha e turgor celular) e sinais químicos (o hormônio ácido abscísico). Atualmente, a maioria das pesquisas sugere uma combinação de sinalização hidráulica e química que

podem ocorrer juntos ou em tempos diferentes (COMSTOCK, 2002; KALEFETOĞLU & EKMEKÇI, 2005).

Sendo um dos fatores de regulação dos estômatos, o ácido abscísico (ABA) é sintetizado nos cloroplastos e outros plastídios e detectado na maioria dos órgãos ou tecidos vivos. Na área foliar quando o mesófilo torna-se moderadamente desidratado, parte do ABA armazenado nos cloroplasto é liberado para o apoplasto e redistribuído dependendo da permeabilidade das membranas e gradientes de pH dentro da folha, possibilitando ao fluxo de transpiração transportar parte dele para as células-guarda (HARTUNG *et al.*, 1998). Em condições de déficit hídrico há um aumento na concentração do ABA na parte aérea quando comparado com a concentração na parte radicular exposta ao déficit. Após a percepção do déficit hídrico no solo pelas raízes, ocorre um acúmulo de ABA e sua redistribuição aos tecidos da planta via xilema sinalizando quimicamente para o fechamento dos estômatos (LIU *et al.*, 2005). Esta resposta foi demonstrada em plantas de *Arabidopsis thaliana* que expressaram a enzima ABA aldeído oxidase (AAO3) que catalisa o passo final na biossíntese de ABA, ao longo da vasculatura da folha, tecido da epiderme e células-guarda (SEO *et al.*, 2000; GONZÁLEZ-GUZMAN *et al.*, 2004; KOIWAI *et al.*, 2004; CHRISTMANN *et al.*, 2005). Há ainda, a indicação de que não somente o ABA, mas também o pH e a redistribuição iônica desempenhem um importante papel na sinalização entre as raízes e as partes aéreas do vegetal, em condições de seca (WILKINSON & DAVIES, 2009).

O fechamento estomático pode contribuir para a diminuição da perda de água da folha para a atmosfera, mas, em contrapartida provoca uma redução na atividade fotossintética, pois a limitação na assimilação de CO₂ afeta

diretamente os processos fotossintéticos, causando um desequilíbrio entre a atividade fotoquímica do fotossistema II (FS II) e a quantidade de elétrons que é exigida no processo (HE *et al.*, 1995, FLAGELLA *et al.*, 1998). A inibição nas reações na cadeia de transporte de elétrons pode formar espécies de oxigênio reativo, os quais podem causar prejuízos fotooxidativos e fotoinibição (KALEFETOĞLU & EKMEKÇI, 2005). Estudos em cloroplastos isolados mostraram que os dois fotossistemas (FSI e FSII), especialmente o PSII, são afetados pela seca (HE *et al.*, 1995). Essa limitação da fotossíntese pode reduzir o consumo de elétrons liberados da água, causando o excesso de energia de excitação, que se não for eliminado com segurança pode ocasionar danos aos fotossistemas (MULLER *et al.*, 2001; LAWLOR, 2002). Quando a energia armazenada nas clorofilas, ou seja, o estado excitado da clorofila não é rapidamente dissipado pela transferência de excitação ou fotoquímica, a reação com o oxigênio, acaba formando as espécies reativas de oxigênio (ROS, Reactive Oxygen Species), que incluem o singlete (1O_2), ânions radicais de superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), radicais hidroxilas (OH^{\bullet}) e peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) (CHAVES *et al.*, 2003; APEL *et al.*, 2004). Estas espécies reativas causam danos fotooxidativos, principalmente em proteínas (D1) do centro de reação do fotossistema II e destroem componentes da membrana dos tilacóides, em especial os lipídeos (LAWLOR & CORNIC, 2002). A fotoinibição chega a ocorrer somente em condições de estresse hídrico muito severo e com quase completamente os estômatos fechados (FLEXAS & MEDRANO, 2002).

Com a redução da fotossíntese, a quantidade de fotoassimilados também diminui, assim como a sua exportação das folhas, uma vez que, o transporte do floema depende do turgor e do potencial hídrico disponível para o

movimento dos assimilados. Entretanto, quando isso ocorre, a capacidade de translocação das plantas permite que reservas sejam mobilizadas e utilizadas onde for necessário, um fator-chave na tolerância vegetal à deficiência hídrica (BELIN *et al.*, 2010).

Outro aspecto importante é que o desenvolvimento de um sistema radicial mais profundo, melhor adaptado para a captação mais constante de água, também permite a planta tolerar o déficit hídrico moderado. O redirecionamento dos fotoassimilados possibilita que as raízes cresçam em direção as zonas mais úmidas do solo, diminuindo a quantidade de raízes superficiais. Segundo JAVOT & MAUREL (2002) raízes expostas a longos períodos de déficit hídrico podem responder através de alterações anatômicas e de crescimento, os quais induzem mudanças na capacidade de transporte de água, associadas à suberização, lignificação da parede celular e presença de proteínas de canal de água (aquaporinas) encontradas nas membranas celulares de raízes (MARTRE *et al.*, 2002). Embora seja eficiente, esse mecanismo de resposta pode torna-se um problema quando a planta está em estágio reprodutivo, pois os assimilados são dirigidos também aos frutos, diminuindo o crescimento das raízes e conseqüentemente a absorção de água, tornando as plantas ainda mais sensíveis à seca (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Algumas espécies, em situações de déficit hídrico, também acumulam 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). Este ajuste osmótico, uma das respostas celulares vitais ao déficit hídrico resultante da seca, da salinidade e do frio, permite a manutenção do turgor celular e dos

processos que dependem deste turgor, tais como, expansão e crescimento celular e abertura dos estômatos e fotossíntese, além de manter um gradiente de potencial de água favorável à absorção de água pelas raízes.

Os solutos que participam do ajuste osmótico são inorgânicos, principalmente K^+ e Cl^- ou compostos orgânicos, denominados solutos compatíveis, como prolina e glicina betaína e carboidratos como sacarose, trehalose, pinitol, sorbitol e manitol. Os solutos compatíveis são de baixo peso molecular, altamente solúveis e não são tóxicos em altas concentrações celulares. Esses solutos protegem a planta contra o estresse através do ajuste osmótico mantendo o turgor celular, fazendo detoxificação de espécies de oxigênio reativo e estabilizando as estruturas quaternárias das proteínas (RUIZ- LOZANO, 2003; CHINNUSAMY *et al.*, 2005).

Ainda, quando as plantas estão expostas ao déficit hídrico, acentua-se a produção do hormônio etileno que leva à senescência e a abscisão foliar, uma outra resposta de defesa ao estresse imposto (PIERIK *et al.*, 2007).

2.2.2. Respostas Moleculares

As plantas tem se adaptado para responder a estresses em níveis moleculares e celulares bem como fisiológicos e bioquímicos (YAMAUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2006). Enquanto adaptações morfológicas e anatômicas podem ser de vital importância para algumas espécies, estas não acontecem em todas as plantas. Em contraste, as respostas celulares para estresse hídrico parecem ser conservadas em todo o reino vegetal (RUIZ-LOZANO, 2003). Em nível molecular, déficits hídricos iniciam várias mudanças

na expressão gênica, as quais definem as respostas de proteção de uma planta. Atualmente, muitos esforços estão direcionados na compreensão destes mecanismos e na identificação de produtos de genes que conferem adaptação a seca (BRAY, 2004).

Os modelos de percepção estabelecidos para vegetais superiores sugerem algumas hipóteses para o início da sinalização em nível molecular. Alterações na conformação de membranas celulares devido à perda de turgor provocariam mudanças em canais de transporte ativados por pressão, modificações na conformação ou na justaposição de proteínas sensoriais, embebidas nas membranas celulares ou alterações na continuidade entre a parede celular e a membrana plasmática (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000; NEPOMUCENO *et al.*, 2001). Devido à perda de pressão da parede, complexos enzimáticos ativados pelas alterações mencionadas, iniciariam uma cascata de eventos moleculares levando a indução da expressão de várias categorias de genes (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

Os produtos desses genes envolvidos na resposta ao estresse funcionam como osmoprotetores, detoxificantes celulares, proteínas “turnover”, proteínas de sinalização de estresse e de regulação transcricional, sendo classificados em dois grupos: o primeiro grupo inclui as proteínas funcionais, ou seja, que protegem diretamente contra a dessecação, como proteínas LEA, osmoprotetores e o segundo grupo estaria envolvido nos mecanismos de sinalização e de regulação da expressão gênica (BRAY, 2004; MOCHIDA *et al.*, 2009), representado por fatores de transcrição.

Genes codificando enzimas envolvidas na biossíntese de osmoprotetores incluem: Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase (síntese de prolina); trehalose-6-fosfato desidrogenase (síntese de trehalose); colina desidrogenase e colina oxidase (síntese de glicina betaína); e manitol-1-fosfato desidrogenase (síntese de manitol) (HONG *et al.*, 2000; NEPOMUCENO *et al.*, 2001; MOLINARI *et al.*, 2004).

O aminoácido prolina, está envolvido nas respostas de defesa a desidratação pela capacidade de estabilizar estruturas celulares e eliminar radicais livres, participar como componente da cascata de sinalização molecular do estresse e ser o principal constituinte de proteínas de parede celular em plantas (NANJO *et al.*, 1999). Em tabaco, o nível elevado de prolina reduziu os níveis de radicais livres em resposta ao estresse osmótico e melhorou significativamente a taxa de crescimento de mudas transgênicas em solos salinizados e desidratados (HONG *et al.*, 2000). YAMADA *et al.* (2005) através de transformação genética em *Petúnia hybrida* cv. Mitchell, com os genes “1-pyrroline-5-carboxilato sintetase” de *Arabidopsis thaliana* (*AtP5CS*) e (*OsP5CS*) de *Oryza sativa*, verificaram que as plantas transgênicas acumularam de 1,5- 2,6 vezes mais prolina do que plantas crescidas sob condições normais.

A trehalose é um açúcar raro com habilidade única de proteger biomoléculas durante estresse ambiental está presente em varias bactérias, fungos e em algumas plantas superiores resistentes ao ressecamento (ELBEIN *et al.*, 2003). AVONCE *et al.* (2004) verificaram que a super expressão do gene *AtTPS1* que codifica a enzima trehalose-6-fosfato sintase na via biossintética de

trehalose em *A. thaliana* promoveu um aumento nos níveis de trehalose-6-fosfato fosfatase também pertencente a essa via biossintética e demonstrou tolerância à seca.

Em plantas, o osmoprotetor glicina-betaína é sintetizado no cloroplasto por dois processos: o primeiro passo converte colina em betaína aldeído e o segundo passo converte a betaína aldeído em glicina-betaína, que é catalisada pela enzima betaína aldeído desidrogenase (WANG et al., 2003). Plantas transgênicas de *A. thaliana* transformadas com o gene da enzima colina oxidase (*codA*) isolado de *Arthrobacter globiformis*, o qual converte colina a glicina aldeído, mostraram aumento na tolerância aos estresses salino e frio devido ao acúmulo de glicina betaína (HAYASHI et al., 1997).

O mesmo foi observado em relação ao manitol em plantas de tabaco transformadas com o gene *mtlD*, que codifica a enzima manitol-1-fosfato desidrogenase. O maior acúmulo de manitol em plantas transgênicas promoveu aumento na tolerância a altas concentrações salinas em comparação a plantas não transformadas (TARCZYNSKY et al., 1993).

A família de oligossacarídeos “Raffinose Family Oligosaccharides” (RFOs), como a rafinose, estaquiase e verbascose também representam uma função de tolerância ao estresse hídrico. Estes oligossacarídeos são comuns no reino vegetal, abundantes em sementes de uma grande variedade de espécies, e podem acumular em outros tecidos durante o estresse. A galactinol sintase (Gols) é uma enzima chave na produção de RFOs, ela sintetiza o galactinol a partir de UDP-Galactose e mioinositol, o qual serve como um doador de galactosil para formar rafinose, estaquiase e verbascose (PATTANAGUL & MADORE, 1999; PANIKULANGARA et al., 2004). Altos

níveis de expressão do gene *GmGoIS* foram detectados em folhas de soja submetidas a condições de déficit hídrico (STOLF, 2005). Da mesma forma, TAJI *et al.*, 2002, também detectaram aumento no nível de galactinol e rafinose em folhas de plantas transgênicas expressando o gene *GoIS2*.

Estresses abióticos geralmente causam disfunção em proteínas e enzimas. As chaperonas moleculares têm função de auxiliar no dobramento de cadeias polipeptídicas nascentes, no redobramento de proteínas desnaturadas e prevenir a agregação de partes protéicas cujas superfícies hidrofóbicas estão expostas prejudicando o dobramento, o que contribui para a omeostase celular em condições de estresse hídrico. Muitas chaperonas moleculares são proteínas envolvidas em respostas de estresse e muitas delas foram originalmente identificadas como “Heat-Shock Proteins” (HSPs) (LINDQUIST, 1988). As principais famílias de HSPs/chaperonas reconhecidas são: HSP70, chaperoninas, HSP90, HSP100 e “small HSP” (sHSP). As diferentes classes de HSPs/chaperonas cooperam na proteção celular e apresentam complementaridade e algumas vezes sobreposição de funções na proteção de proteínas contra o estresse (WANG *et al.*, 2004).

O grupo de proteínas chamadas “Late Embryogenesis Abundant” (LEA), como o próprio nome sugere, são acumuladas em sementes durante a fase de maturação, quando é requerida a tolerância a dessecação (CLOSE, 1996; NEPOMUCENO *et al.*, 2001). 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). Essas proteínas são reconhecidas por serem hidrofílicas, apresentando um alto conteúdo de glicina (WISE *et al.*,

2004). Durante a desidratação celular as proteínas LEA representam uma importante função na manutenção da estrutura de outras proteínas, vesículas, endomembranas e no seqüestro de íons, como o cálcio, na retenção de água e como chaperonas moleculares (CLOSE, 1996).

Um importante avanço para o entendimento da condutância de água nas células foi a descoberta das proteínas de canais de água, denominadas aquaporinas. A presença de aquaporinas pode aumentar a condutividade hidráulica da membrana (PRESTON *et al.*, 1992) e formar canais de água específicos para íons ou solutos, facilitando o movimento da água através dos tecidos (BRAY, 1993). Folhas de plantas transgênicas de arroz expressando a aquaporina de cevada HvPIP2;1 apresentaram um aumento de 40% na condutância interna de CO₂, assim como um aumento na taxa de assimilação de CO₂ (KATSUHARA *et al.*, 2008).

Diversas estratégias de transformação de plantas utilizando genes antioxidantes para eliminar componentes tóxicos como O₂, H₂O₂, e OH⁻, mostram auxiliar no aumento da tolerância à seca. Esses antioxidantes incluem enzimas como a Catalase (CAT), Superóxido Desmutase (SOD), Ascorbato Peroxidase (APX) e Glutathione Redutase (GR), assim como, as moléculas não enzimáticas; ascorbato, glutathione, carotenóides e antocianinas. Componentes adicionais como os osmólitos, proteínas (peroxiredoxina) e moléculas anfífilas (tocoferol) podem também ter funções de eliminação de ROS (BOWLER *et al.*, 1992). Alfafas (*Medicago sativa*) transgênicas expressando o gene Mn-SOD evidenciaram redução nas lesões em folhas causadas por estresse hídrico (MCKERSIE *et al.*, 1999). Ainda, sobrepondo o papel de ROS como um agente oxidativo, descobriu-se que esses podem estar envolvidos em processos de

sinalização. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) atua como um mensageiro secundário mediando a aquisição de tolerância a ambos os estresses, biótico e abiótico. Também foi verificado que ROS comunica-se com outras moléculas sinalizadoras formando parte de vias de sinalização que controlam respostas procedentes a ROS (BHATTACHARJEE, 2005).

2.2.3 Fatores de Transcrição

Os fatores de transcrição são proteínas que regulam a expressão de genes através de seqüências específicas de ligação ao DNA e interação proteína/proteína. Alguns fatores de transcrição têm sido sugeridos como reguladores de respostas a estresses e são classificados dentro de diversas famílias, baseados principalmente na estrutura de seus domínios de ligação ao DNA, como exemplo, os membros das famílias MYB, ERF, bZIP e WRKY (SINGH *et al.*, 2002; JUNG *et al.*, 2008).

Em *Arabidopsis* são conhecidas quatro unidades transcricionais – chamadas de “regulon” que respondem ao déficit hídrico, duas são dependentes de ABA: (1) “ABA – Responsive Element Binding protein/ ABA – responsive element Binding Factor” (**AREB/ABF**), (2) “myelocytomatosis oncogene” (**MYC**) e “myeloblastosis oncogene” (**MYB**); e duas são independentes de ABA: (3) “Dehydration Responsive Element Binding protein” (**DREB**), (4) NAM, ATAF1, 2, e CUC2 (**NAC**) e “Zinc-Finger Homeodomein” (**ZF-HD**) (NAKASHIMA & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006).

O “regulon” dependente de ABA, AREB/ABF controla a região promotora dos genes que possuem o maior cis-elemento da expressão gênica ABA-

dependente: o ABRE (ABA-Responsive Elements: ACGTGG/TC). UNO *et al.* (2000) analisaram o promotor do gene de resposta ao frio *RD29B*, e identificaram dois ABREs que funcionavam como cis-elementos regulatórios na expressão ABA-dependente. Eles também verificaram que as proteínas AREB (AREB2 e AREB3) possuem o “motif” zíper de leucina com um único domínio DNA-ligante e são fatores de transcrição em resposta a desidratação regulados por ABA.

Em *A. thaliana*, os fatores de transcrição MYC (*AtMYC2*) e MYB (*AtMYB2*) também são dependentes e tem mostrado-se ligar aos cis-elementos MYC (*MYC-recognition site*: CANNTG) e MYB (*MYB-recognition site*: C/TAACNA/G) respectivamente, presentes no gene *RD22*. Esses “regulons” são responsáveis pela resposta tardia ao estresse, sendo sintetizado principalmente após o acúmulo de ABA (NAKASHIMA & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2005).

Em estudo realizado em *A. thaliana*, NAKASHIMA *et al.* (1997) descobriram que o gene *ERD1* (early responsive to dehydration stress 1) responde ao déficit hídrico e ao estresse salino mas não a ABA, através da codificação de uma proteína homóloga a subunidade ATPase (ClpA) da protease Clp (caseinolytic protease). Na região promotora desse gene há uma sequência CACTAAATTGTCAC e um “motif” CATGTG que é reconhecido por fatores de transcrição NAC, além de um domínio de ligação a fatores de transcrição de homeodomínios (ZF-HD) (NAKASHIMA & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2005; JENSEN *et al.*, 2008).

Também na via independente de ABA, o “regulon” DREB, classificado em dois grupos, DREB1 (DREB1A, DREB1B, DREB1C, DREB1D, DREB1E e

DREB1F) (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000) e DREB2 (DREB2A e DREB2B) (SAKUMA *et al.*, 2006), ativam a expressão de genes ligando-se ao cis-elemento DRE (Dehydration Responsive Element) presente em seus promotores.

2.3. A família DREB1A

Nas últimas décadas, importantes progressos foram obtidos na compreensão do controle da expressão de genes em resposta a estresses ambientais. Em particular, a família de fatores de transcrição de *Arabidopsis thaliana* conhecida como DREB (LIU *et al.*, 1998; YAMAGUCHI-SHINOZAKI *et al.*, 2002) ou CBF (C-Repeat-Binding factor) (STOCKINGER *et al.*, 1997; GILMOUR *et al.*, 1998), tem sido amplamente estudada. Recentemente, outros genes também homólogos a essa família, *OsDREB1A*, *OsDREB1B*, *OsDREB1C*, *OsDREB1D*, e *OsDREB2A* foram isolados em arroz (DUBOUZET *et al.*, 2003), *GmDREBa*, *GmDREBb* e *GmDREBc*, em soja (LI *et al.*, 2005) e *ZmDREB1A* em milho (QIN *et al.*, 2004), assim como em outras espécies.

Os primeiros trabalhos sobre essa família de fatores de transcrições foram realizados por YAMAGUCHI-SHINOZAKI *et al.* (1992), através da identificação de cDNAs de *A. thaliana*, nomeados “Responsive to Desiccation” (RD), os quais foram expressos não somente em resposta ao déficit hídrico, mas também, ao estresse salino, a baixa temperatura e ao ácido abscísico (ABA).

A caracterização dos genes *RD29A* e *RD29B* correspondentes ao clone RD29 revelaram que as proteínas codificadas por esses genes *RD29* são

extremamente hidrofílicas, e contém somente um resíduo de cisteína, o que as torna similar à estrutura das proteínas LEA também induzidas por dessecação (BAKER *et al.*, 1988; YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 1993; YAMAGUCHI-SHINOZAKI *et al.*, 2002). Em tratamentos de desidratação em plantas de *A. thaliana*, o gene *RD29A* foi detectado em níveis de expressão baixos dentro de vinte minutos e altamente expresso depois de três horas, enquanto *RD29B* foi detectado somente após três horas do início da desidratação. Entretanto, quando foram feitos tratamentos com aplicação de ABA, essa rápida indução de *RD29A* não foi detectada, mas após duas horas a expressão de ambos, *RD29A* e *RD29B* foi detectada. Esses resultados sugerem a ausência de algum elemento envolvido na rápida indução de *RD29A* em tratamento de desidratação (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 1993).

Tais observações propunham a existência de dois elementos *cis*-atuantes na região promotora de *RD29A*, sendo um deles relacionado a mudanças nos potenciais osmótico e hídrico da célula, ou seja, independente de ABA e responsável pela rápida indução de *RD29A* durante estresse ambiental e outro dependente de ABA, envolvido na resposta a expressão do hormônio ABA. Os genes *RD29B* e *RD29A* estão arranjados em *tandem*, em uma região de 8kb no genoma de *A. thaliana*, um espaço de aproximadamente 1640 pb entre *RD29B* e *RD29A*, conteria esses elementos *cis*-atuante.

Análises de deleção e de substituição de bases na região promotora do gene *RD29A* em plantas transgênicas de tabaco revelaram uma seqüência conservada de 9 pares de bases (TACCGACAT) nomeada “Dehydration Responsive Element” (DRE), que possui alta similaridade com a seqüência

“Responsive to Dehydration” (DR1) do promotor *rd17*, sendo essencial na regulação da expressão de *RD29A* sob condições de seca (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 1994). A seqüência CCGAC do elemento DRE é a seqüência mínima para que ocorra a ligação da proteína ao promotor e, C4, G5 e C7 são essenciais para interação de proteínas específicas (HAO *et al.*, 2002; SAKUMA *et al.*, 2002). O elemento ABRE também foi identificado e estaria envolvido na indução do promotor *RD29A* durante a presença de ABA (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 1994).

Através da técnica de ensaio de um híbrido, LIU *et al.* (1998) isolaram clones de cDNA que codificam proteínas (DREB1A e DREB2A) que se ligam à região DRE. A seqüência de aminoácidos das proteínas DREB1A e DREB2A mostrou alta similaridade com o domínio conservado encontrado na proteína *Apeta2* (AP2) de *A. thaliana* (JOFUKU *et al.*, 1994; OKAMURO *et al.*, 1997) que funciona em resposta a morfogênese floral, e com a proteína “Ethylene-responsive element binding factors” (ERF) que funciona em resposta ao etileno (OHME-TAKAGI & SHINSHI, 1995; HAO *et al.*, 2002). Apesar do domínio AP2 das proteínas DREB terem alta similaridade com o mesmo domínio nas proteínas ERF, não é claro como essas proteínas reconhecem diferentes sítios e regulam a expressão de genes em vias diferentes (SAKUMA *et al.*, 2002).

O domínio AP2 tem sido considerado exclusivo de plantas e possui uma região conservada de aproximadamente 60 aminoácidos (RIECHMANN & MEYEROWITZ, 1998). Entretanto, as proteínas DREB contêm uma região básica na região N-terminal que pode funcionar como um sinal de localização nuclear e uma região C-terminal ácida que atua como um domínio de ativação para a transcrição, indicando que essas proteínas podem funcionar como um

ativador de transcrição em plantas (LIU *et al.*, 1998; YAMAGUCHI-SHINOZAKI *et al.*, 2002).

O fator de transcrição DREB1A interage especificamente com a região DRE induzida por estresse e ativa um grande número de genes em resposta a seca. A utilização do promotor *RD29A* contendo a região DRE e a região codante do fator de transcrição DREB1A tem demonstrado promover tolerância à seca em plantas transgênicas como *A. thaliana*.(KASUGA *et al.*, 1999), trigo (PELLEGRINESCHI *et al.*, 2002) e tabaco (KASUGA *et al.*, 2004). Plantas transgênicas de trigo e tabaco expressando o fator de transcrição DREB1A de *A.thaliana* sugerem a conservação desses genes no reino vegetal. Assim, a superexpressão da proteína DREB1A apenas em condições de déficit hídrico utilizando promotores induzidos por estresse tem potencial como estratégia no desenvolvimento de culturas mais tolerantes à seca em espécies de relevância econômica como a soja.

2.4. Plantas Geneticamente Modificadas

Desde 1996 quando a primeira cultura geneticamente modificada (GM) foi produzida e consumida no mercado norte americano, o tomate “Flavr Savr”, outras culturas como soja, milho e canola tem sido adotadas ao redor do mundo, refletindo em um aumento de mais de 67 vezes na área global de lavouras transgênicas (KRAMER & REDENBAUGH, 1994; ROLLA, 2009; ISAAA, 2009).

Estudos demonstram que somente em 2009, 14 milhões de agricultores de 25 países contribuíram para que a área plantada com culturas transgênicas ultrapassasse 134 milhões de hectares, representando um crescimento de 7% em relação a 2008, ou seja, nove milhões de hectares. Dentre os países que adotaram culturas de plantas GM, o Brasil ocupa o segundo lugar no ranking mundial, com 21,4 milhões de hectares, atrás apenas dos Estados Unidos que possui 64 milhões. Nos países em desenvolvimento, a área plantada com produtos transgênicos cresceu 46% nesses últimos 13 anos e espera-se que supere 50% até 2015 (JAMES, 2009).

Diante a crescente demanda mundial por alimentos, a agricultura moderna depara-se frente às mudanças climáticas geradas especialmente por aumento de temperatura, assim como, a busca por uma melhor qualidade de vida e uma alimentação mais saudável (VALLIYODAN & NGUYEN, 2006;, 2008). Neste contexto, para os próximos anos, a biotecnologia agrícola trará impactos para a agricultura e para os consumidores, os quais deverão englobar aumento da produtividade, benefícios socioeconômicos, proteção da biodiversidade e desenvolvimento de produtos que permitam controlar as

perdas causadas pelas mudanças climáticas, assim como aumento de teor nutricional e características farmacêuticas e/ou industriais, cabendo nestes casos um controle, pela sociedade científica, das tecnologias adotadas (TAYLOR & HEFLE, 2001; ISAAA 2009).

Entre as características que deverão ser introduzidas em cultivares, a tolerância a seca é vista como o traço de grande relevância a ser desenvolvido e liberado no mercado, nesta segunda década de comercialização de culturas GM (VALLIYODAN & NGUYEN, 2006; ISAAA, 2009). Diferentes instituições públicas e privadas têm concentrado esforços no desenvolvimento de cultivares que possam tolerar períodos prolongados de estiagem, visando aumentar a produção agrícola mundial em níveis que permitam alimentar uma população em constante crescimento. Como exemplo a parceria nomeada “Water Efficient Maize program for Africa” (WEMA) a qual é coordenada pela “African Agricultural Technology Foundation” (AATF), envolvendo a Monsanto (doadora da tecnologia livre de “royalties”) e o Centro Internacional de “Mejoramiento de Maíz y Trigo” (CYMMYT) pretende lançar até 2017 o primeiro milho “royalty-free” tolerante a seca para o benefício de pequenos agricultores na África subsariana (WEMA, 2010).

Embora as experiências já vivenciadas com a adoção de transgênicos mostrem que os avanços alcançados através da biotecnologia tenham um grande potencial para melhorar o bem-estar humano, esta tecnologia deve continuar a ser desenvolvida com medidas de segurança adequadas, no intuito de minimizar ou mesmo anular a possibilidade de um alimento não seguro chegar ao mercado (KUIPER *et al.*, 2001; OECD, 2008). Para isso, diferentes instituições como “International Food Biotechnology Council” (IFBC),

“Organisation for Economic Cooperation and Development” (OECD), “Food and Agriculture Organisation of the United Nations” (FAO), “World Health Organisation” (WHO) e “International Life Science Institute” (ILSI), propõem estratégias para a avaliação de segurança de OGMs, antes, durante e depois de sua liberação, garantindo assim, a saúde do consumidor (OLIVEIRA & WATANABE, 2004). Neste sentido, há um consenso internacional no que diz respeito à avaliação da segurança alimentar destes novos produtos, estando também inserida a equivalência substancial (CODEX ALIMENTARUS, 2009), uma abordagem comparativa que permite a identificação de possíveis diferenças entre OGMs ou transgênico e seu análogo convencional. Dependendo do caso, testes adicionais relativos à toxicologia, alergenicidade, além da identificação e caracterização dos chamados efeitos não-intencionais são também realizados, visando assim, garantir com segurança a introdução de novas variedades no mercado (SOCIETY OF TOXICOLOGY, 2003).

2.5. Ferramentas de Análises para o Estudo da Resposta ao Estresse em Plantas

Avanços metodológicos têm revolucionado o caminho para o estudo e o conhecimento de respostas a diferentes estresses em plantas. As áreas de genômica, transcritoma e proteômica oferecem ferramentas que permitem elucidar os mecanismos moleculares subjacentes à resposta das plantas ao estresse no seu habitat natural sob diferentes níveis (CHAVES *et al.*, 2003). Os genomas de plantas podem ser estudados, desde sua organização em nível estrutural, buscando seqüenciar e identificar regiões genômicas importantes,

até a identificação de genes em nível transcricional e protéico que estejam envolvidos nas respostas a diferentes estresses.

Diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas para permitir a análise total e/ou pontual da expressão gênica das espécies. Tecnologias como “Serial Analysis for Gene Expression” (SAGE), “Massively Parallel Signature Sequencing” (MPSS) e pirosequenciamento não requerem conhecimento prévio das seqüências dos transcritos e, dessa forma, é possível a identificação de transcritos desconhecidos (NIELSEN *et al.*, 2003; TALLA *et al.*, 2003). O que define uma arquitetura do tipo aberta para análise da expressão gênica. Em contrapartida, arquiteturas fechadas, como a maioria dos microarranjos de DNA, são baseadas na existência do conhecimento prévio dos genes, com sondas desenhadas para se ligarem a transcritos conhecidos (KUO *et al.*, 2002).

Quando níveis de expressão de um determinado gene são estudados, atualmente, a técnica de “RT-qPCR” é a mais precisa na quantificação. Além disso, esse método também oferece dados rápidos e reprodutíveis (HAYWARD-LESTER *et al.*, 1995; GINZINGER, 2002). Os sinais de fluorescência são gerados por fluoróforos que são específicos para a fita dupla de DNA (dsDNA) ou por “primers” marcados por fluorescência em regiões específicas (KLEIN *et al.*, 2002). O sinal é proporcional à quantidade de produto de “PCR” e o equipamento detecta o acúmulo do produto amplificado durante cada ciclo da reação (BUSTIN, 2002). Os dados são, então, medidos na fase exponencial da reação de “PCR” (HEID *et al.*, 1996), sendo utilizado um gene constitutivo para normalização dos dados da reação.

Como visto, todas as tecnologias fornecem dados com diferentes utilizações e interpretações (MEYERS *et al.*, 2004), entretanto, nenhuma das tecnologias existentes suporta todas as necessidades experimentais. Para cada uma delas há vantagens e desvantagens (CLOSE *et al.*, 2004), o que as tornam complementares e permitem alcançar a validação necessária.

Uma das principais limitações das ferramentas genômicas é que a alteração da expressão do gene não leva necessariamente a uma resposta funcional; modificações pós-transcricionais e/ou pós-traducionais podem impedir que um gene de resposta possa ser traduzido em uma proteína funcional. A análise de transcrito usando diferentes tecnologias, como microarranjos e “RT-qPCR”, são ferramentas importantes para estudo de função gênica, por outro lado, a proteômica fornece uma avaliação direta das proteínas expressas e, portanto, da relação funcional dos genes relacionados a um processo específico.

Para avaliar os efeitos do estresse sobre o proteoma, os pesquisadores têm utilizado tradicionalmente eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) para separar as proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico (primeira dimensão) e peso molecular (segunda dimensão) (XU *et al.*, 2006). Uma desvantagem dessa técnica é a sua baixa reprodutibilidade e a grande diversidade de proteínas, o que requer várias etapas de extração de separação. Entretanto, essas deficiências têm incentivado o desenvolvimento de novas técnicas para responder à exigência de análise de alto rendimento em proteômica, especialmente frente à era pós-genômica.

Recentes avanços têm permitido uma análise mais quantitativa, reprodutível, aliada a identificação de um maior número de proteínas. Análises

espectrométricas por meio de técnicas de ionização do tipo “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization” (MALDI) ou “Electrospray Ionization” (ESI) são atualmente mais recomendáveis para o estudo de compostos não voláteis e termolábeis, como peptídeos e proteínas (GLISH & VACHET, 2003). Ambas as técnicas, normalmente associadas ao analisador “Time-of-flight” (TOF) e as técnicas iniciais de preparo de amostras, podem fornecer a massa de um grande conjunto de peptídeos em tempo curto, e com alta acurácia (JOHNSSON, 2001).

Todos esses avanços tecnológicos, assim como, o seqüenciamento completo de alguns organismos tem contribuído como uma ferramenta importante na identificação de genes. O recente progresso nos estudos dos genomas estruturais e funcionais e estudos de metaboloma têm levado a descoberta de genes em muitas espécies (PANDEY & MANN, 2000). A principal questão agora é determinar quais desses genes de resposta a estresse são importantes para a tolerância aos diferentes tipos de estresses existentes (ABBOTT, 1999; KAWASAKI *et al.*, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Avaliação preliminar de biossegurança alimentar da proteína *AtDREB1A* e obtenção de soja geneticamente modificada com a construção *RD29A:AtDREB1A* para tolerância a seca, assim como, identificação de proteínas de soja diferencialmente expressas em resposta ao déficit hídrico.

3.2. Objetivos Específicos

- Análise *in silico* de similaridade entre a seqüência de aminoácidos da proteína *AtDREB1A* com seqüências de proteínas antinutricionais, tóxicas e/ou alergênicas e busca por sítios de N-glicosilação.
- Produção da proteína recombinante *AtDREB1A* através de sistema heterólogo para investigação de potencial atividade hemolítica contra eritrócitos humanos em ensaios de hemólise.
- Desenvolvimento de soja geneticamente modificada com a construção *RD29A:AtDREB1A/CBF3* para tolerância a seca.
- Análise da indução do promotor *RD29A* e expressão do fator de transcrição *AtDREB1A* para a ativação de genes de soja em resposta ao déficit hídrico.
- Caracterização fisiológica, morfológica e agrônômica de plantas geneticamente modificadas, para avaliação de aumento de tolerância a seca.
- Análise comparativa do perfil protéico de plantas de soja P58 GM e BR16 não GM submetidas ao déficit hídrico, visando identificar proteínas de soja diferencialmente expressas em resposta a seca.

4. Formato e Organização da Tese

Esta tese é composta por três capítulos, cada qual com Justificativa, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão e Bibliografia. Ao final da tese, são apresentadas as Considerações Finais, Referências Bibliográficas da Revisão de Literatura e Anexos.

Capítulo 1. Avaliação preliminar de biossegurança alimentar da proteína recombinante DREB1A/CBF3 de *Arabidopsis thaliana*.

Capítulo 2. Improving Drought Stress Tolerance in Soybean by Introgression of the *RD29A: AtDREB1A/CBF3* construct.

Capítulo 3. Análise proteômica de soja GM (geneticamente modificada) e não GM submetidas a déficit hídrico.

Capítulo 1

Avaliação preliminar de biossegurança alimentar da proteína recombinante DREB1A/CBF3 de *Arabidopsis thaliana*

RESUMO

A proteína DREB1A/CBF3 de *Arabidopsis thaliana* é um fator de transcrição que interage com uma seqüência regulatória específica A/GCCGAC nomeada DRE, presente na região promotora de genes envolvidos em resposta a estresses ambientais. Diversos trabalhos demonstram que a expressão da proteína AtDREB1A regulada por um promotor estresse induzido (*RD29A*) em plantas transgênicas, promove aumento a tolerância à seca, uma estratégia promissora para o melhoramento de culturas agronomicamente importantes. Entretanto, para a introdução de uma nova característica em diferentes espécies, a avaliação de segurança da proteína expressa é uma etapa inicial no desenvolvimento de produtos agrícolas geneticamente modificados, conforme documentado por órgãos como a FAO/WHO e ILSI. Com base nessas recomendações, neste trabalho a avaliação *in silico* da proteína AtDREB1A mostrou que a proteína não possui características de toxicidade, alergenicidade ou efeito antinutricional. Sítios de N-glicosilação também não foram identificados, assim como, efeitos de hemólise em eritrócitos de humanos atestados com a proteína AtDREB1A produzida *in vitro* em uma concentração de 100µg/mL. Em uma avaliação mais refinada análises de microscopia de força atômica não mostraram alterações na superfície de eritrócitos de humanos quando em contato com a proteína. Em conjunto, esses estudos e o amplo conhecimento sobre a função biológica e modo de ação da proteína AtDREB1A, integram a etapa preliminar da avaliação de segurança de proteínas recombinantes, indicando que a proteína AtDREB1A não causa efeitos adversos nas condições atestadas.

1. INTRODUÇÃO

A avaliação de segurança de novas proteínas expressas é uma importante etapa na avaliação de segurança de culturas geneticamente modificadas (GM) a fim de prevenir a introdução de proteínas alergênicas ou com outras funções adversas já conhecidas (HILEMAN *et al.*, 2002; CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2009). Apesar do retrospecto de biossegurança alimentar favorável quanto à utilização de proteínas heterólogas para obtenção de culturas GM, nem todas as proteínas intencionadas para a transformação de plantas são componentes de alimentos ou fazem parte da dieta de humanos ou animais, o que torna necessária essa etapa inicial de investigação.

Para que se minimizem as dúvidas sobre o potencial efeito de reação cruzada da proteína em questão com outras proteínas indesejadas, um processo de avaliação preciso e coerente deve ser formado (FAO/WHO, 2001). Neste contexto, o Comitê Internacional de Biotecnologia de Alimentos (ILSI) desenvolveu uma abordagem científica para a avaliação de novas proteínas expressas levando em consideração a totalidade dos dados de maneira holística. A abordagem recomenda uma avaliação em duas etapas que contemplam diferentes análises e sugere que o valor preditivo a cada evidência obtida deve ser bem compreendido a fim de dar a certos dados maior relevância do que a outros durante a avaliação, acrescentando uma maior confiança a avaliação completa (DELANEY *et al.*, 2008). Em síntese, o valor de predição de dados individuais pode não ser claramente definido, mas ensaios ou métodos adicionais continuarão a melhorar seu valor preditivo.

As etapas propostas incluem a identificação do perigo potencial da proteína na etapa I e a caracterização do perigo na etapa II, a qual é conduzida quando os resultados da primeira etapa não são suficientes para a determinação de segurança, podendo estar inclusos estudos de toxicidade aguda (CODEX ALIMENTARUS, 2009). Situações na qual a proteína investigada possua um histórico de uso seguro, como proteínas de tolerância a seca, o conhecimento obtido apenas na etapa I (histórico de uso seguro, análises de bioinformática, modo de ação, digestibilidade *in vitro*, estabilidade térmica, níveis de expressão e ingestão dietética) pode ser suficiente para gerar informações acerca de sua segurança para expressão em culturas de interesse agrícola e, conseqüente, utilização para alimentação humana e/ou animal (EFSA, 2006; DELANEY *et al.*, 2008).

O fator de transcrição DREB1A/CBF3 é uma proteína que se liga a um promotor específico induzido por estresse abiótico, contendo 216 aminoácidos, massa molecular de 24,2 kDa e membro de uma família que possui o domínio ERF/AP2 altamente conservado em plantas (YAMAGUCHI-SHINOZAKI *et al.*, 2002; HAO *et al.*, 2002). Desde o isolamento de sua seqüência (LIU *et al.*, 1998; GILMOUR *et al.*, 1998), diversos trabalhos tem demonstrado seu modo de ação durante estresse abióticos (MARUYAMA *et al.*, 2009), assim como sua estrutura, filogenia (SAKUMA *et al.*, 2002, SANGTAE *et al.*, 2006), e genes que estão envolvidos em sua rota metabólica (MARUYAMA *et al.*, 2004; YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2009). Da mesma forma, o organismo de sua origem *Arabidopsis thaliana* possui amplo histórico de estudos (THEOLOGIS *et al.*, 2000; SWARBRECK *et al.*, 2008), sendo um modelo científico em plantas, o que

garante que a proteína DREB1A não levanta preocupações em relação a uma fonte com histórico de toxicidade (MEINKE *et al.*, 1998).

A efetividade da proteína DREB1A em promover tolerância a estresses como seca, salinidade e frio tem sido alcançada em espécies como trigo (PELLEGRINESCHI *et al.*, 2002), batata (BEHNAM *et al.*, 2007) o que desperta um grande interesse sobre um potencial benefício ao programa de melhoramento na busca por cultivares comerciais mais tolerantes a esses estresses. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a biossegurança alimentar da proteína DREB1A/CBF3 de *A. thaliana* a partir da execução das análises *in silico* da primeira etapa de avaliação de segurança de proteínas recombinantes, seguindo as recomendações da ILSI (DELANEY *et al.*, 2008) e do CODEX ALIMENTARIUS (2009), assim como seu potencial hemolítico. As análises de bioinformática foram conduzidas para avaliar a similaridade entre a seqüência de aminoácidos da proteína AtDREB1A com seqüências de proteínas antinutricionais, tóxicas e/ou alergênicas e a presença de sítios de N-glicosilação. Utilizando um sistema heterólogo, a proteína AtDREB1A foi produzida *in vitro* para a investigação de potencial atividade hemolítica contra eritrócitos humanos a partir de ensaio espectrofotométrico, baseado na liberação de hemoglobina. A fim de visualizar danos menores aos eritrócitos após tratamento com a proteína AtDREB1A, análises de microscopia de força atômica foram conduzidas para avaliar a integridade da membrana a partir da captação de dados referente a sua topografia de superfície.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Subclonagem da Proteína DREB1A/CBF3 em Vetor de Expressão de *E. coli*

Para a expressão da proteína DREB1A/CBF3 de *A. thaliana* (GenBank: BAA33434.1) a seqüência de nucleotídeos de DREB1A/CBF3 (GenBank: AB007787.1 e FJ169302.1) foi subclonada no vetor pET101/D-TOPO® (INVITROGEN, United States) segundo instruções do fabricante. Oligonucleotídeos iniciadores específicos *At*DREB1A-F (5' CACCATGAACTCATTCTG 3') e *At*DREB1A-R (5' ATAACTCCATAACGATACGT 3') foram utilizados para adição do sítio de recombinação (CACC) na região 5' da seqüência gênica.

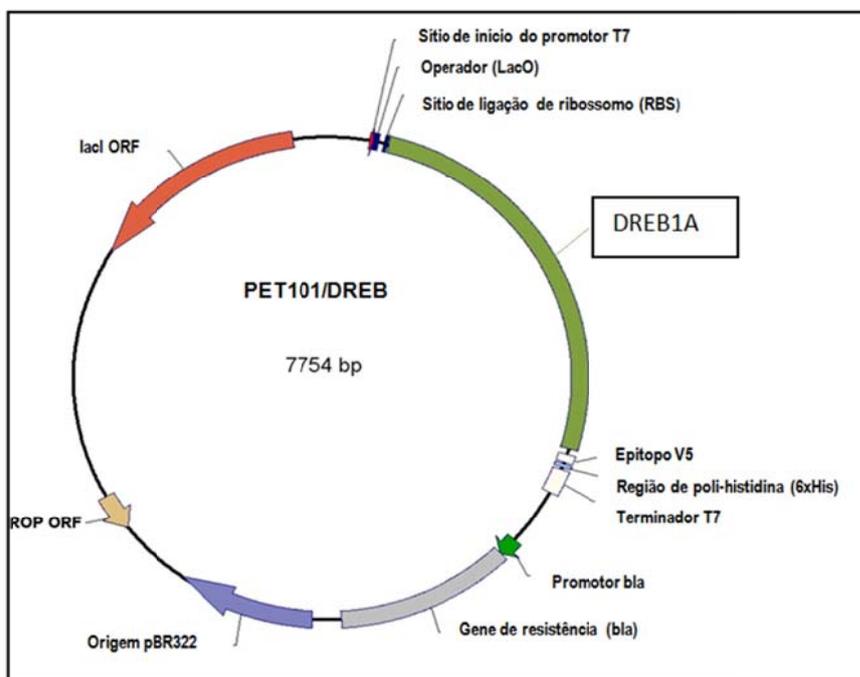


Figura 1. Mapa do vetor PET101/DREB1A utilizado para expressão heteróloga em *E. coli*. O gene *DREB1A/CBF3*, foi inserido pela enzima Topoisomerase no sítio de recombinação GTGG.

2.2. Expressão e Purificação da Proteína DREB1A em *E. coli*

A construção PET101/DREB1A foi utilizada para transformar células de *Escherichia coli* linhagem BL21 Star™(DE3) de acordo com as instruções do fabricante. Uma colônia de bactéria contendo a construção foi cultivada em 5 mL de meio de cultura LB (Luria-Bertani) contendo ampicilina 100µg/mL à 37 °C, durante 16 horas de agitação (200 rpm).

O pré-inóculo foi adicionado a 2 L de meio de cultura LB, contendo ampicilina 100µg/mL e após atingir a OD₆₀₀ de 0,8 a expressão foi induzida pela adição de 0,5mM de IPTG durante 6 horas à 37 °C sob agitação (200 rpm), sendo que uma alíquota da cultura de células não induzida foi coletada e armazenada para posterior análise. Ao final as células foram coletadas por centrifugação (3000 x g, 10 min) e o sedimento foi solubilizado e incubado por 16 horas à 4 °C em 25mL de tampão de lise (50mM de Tampão Fosfato pH 7,8; 300mM NaCl, 10% Glicerol, 0,5% Triton X-100 contendo 10mg/mL de Lisozima), seguido de sonicação (3 pulsos de 1 minuto/cada) e centrifugação para a coleta do sobrenadante (3000 g x 15 min).

Para purificação da proteína DREB1A o sobrenadante lisado foi submetido à cromatografia de afinidade, utilizando-se 5mL da resina Ni-NTA (Ácido Nítrilotriacético-Níquel – QUIAGEN) em cromatografia de fluxo segundo orientações do fabricante. As frações eluídas foram dialisadas contra água, liofilizadas e quantificadas pelo método de BRADFORD (1976) para análise em gel 12% SDS-PAGE.

2.3. Análise da Proteína em Gel de Poliacrilamida

Para a análise da expressão da proteína DREB, 25µg de cada amostra (proteína não induzida, induzida após 6 horas e purificada) foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), conforme procedimento descrito por LAEMMLI, (1970) e visualizadas por coloração com “Coomassie Brilliant Blue R-250”.

2.4. Imunodeteção – Western blot

Para a imunodeteção por Western blot, 25µg da proteína DREB1A semipurificada foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose HYBOND™-C EXTRA utilizando o equipamento TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO-RAD®) e tampão de transferência (192mM de Glicina; 25 mM de Tris-Base; 20% de Metanol). Após, a membrana foi bloqueada com solução de BSA 3% contendo 20mM de Tris HCl; pH 7,5; 150mM de NaCl, seguida de rápida lavagem com TBS-T (TBS contendo 0,05% de TWEEN 20) e incubação com o anticorpo Anti-HIS conjugado com a fosfatase alcalina (1:2000 em TBS) durante 2 horas em temperatura ambiente. Ao final, a membrana foi lavada novamente com TBS-T e revelada com o uso do Kit AP Conjugate Substrate® (BIO RAD), seguindo os procedimentos descritos pelo fabricante.

2.5. Análise de Similaridade com Seqüências de Aminoácidos de Proteínas Antinutricionais, Tóxicas e/ou Alergênicas e Busca Por Sítios de N-glicosilação

2.5.1. Comparação da Seqüência de Aminoácidos da Proteína DREB1A com Antinutrientes, Toxinas e/ou Alérgenos

Uma busca de similaridade entre proteína DREB1A com antinutrientes, toxinas e/ou alérgenos conhecidos foi conduzida *in silico*. A seqüência completa de aminoácidos da proteína DREB1A foi comparada com todas as seqüências presentes em seis grandes bancos de dados públicos presentes no NCBI (NR, Refseq_Protein, SwissProt, Pat, PDB e Env_nr), assim como Uniprot-Swissprot, Uniprot-trEMBL e DDBJ – DAD. Para uma análise do potencial antinutricional, tóxico e/ou alergênico, consideraram-se alinhamentos com mais de 35% de similaridade (FAO/ WHO, 2001).

Utilizando os critérios estabelecidos pela FAO/WHO (2001) uma predição de alergenicidade também foi conduzida acessando os bancos de dados *AllergenOnline*, *SDAP - Structural Database of Allergenic Proteins* e *Allergen Database for Food Safety*. Os critérios estabelecem que uma similaridade entre a nova proteína expressa e uma proteína alergênica conhecida, deve ser considerada quando: 1) há mais de 35% de identidade entre a seqüência de aminoácidos da proteína expressa usando uma janela de leitura de 80 aminoácidos ou, 2) identidade de 6 ou 8 aminoácidos contíguos. Em todas as buscas, o

algoritmo de comparação utilizado foi o BLASTP, que é mantido pelo centro nacional para a informação da biotecnologia (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

2.5.2. Busca por Sítios de N-glicosilação

A sequência completa da proteína DREB1A foi avaliada quanto a presença de sítios de N-glicosilação utilizando o programa *NetNGlyc 1.0 Server*.

2.6. Ensaio de Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica da proteína DREB1A semipurificada (10% de pureza) foi investigada segundo a metodologia descrita por BERNHEIMER (1988) e MERKER & LEVINE (1986), com algumas modificações. Suspensão de eritrócitos a 1 % e sangue total humano foram diluídas em proporção de 1:10 (p/v) em NaCl 0,9 %, contendo várias diluições da proteína liofilizada, de 1mg até 1:1024, o equivalente a 1000, 500, 250, 125, 62,5 , 31,25 , 15,6 , 7,8 e 3,9 µg/ml. Em seguida, os tubos foram incubados em estufa a 37 °C durante 1 h. O grau de hemólise foi calculado pela liberação de hemoglobina, medida por absorbância a 540 nm, após centrifugação a 1000 x g por 5 min. A lise completa (100 %) foi obtida por diluição de 100 µl da suspensão de células 1% ou do sangue total em 900 µl de água destilada, utilizando-se ainda um controle negativo com a mesma proporção de células em solução salina. Uma unidade hemolítica foi definida como a concentração de proteína capaz de produzir 50 % de hemólise em

suspensão de células a 1% ou sangue total durante 1 h. A porcentagem de hemólise foi determinada pela seguinte equação:

$$(\%) \text{ Hemólise} = \frac{\text{Abs} - \text{Abs}_0}{\text{Abs}_{100} - \text{Abs}_0} \times 100$$

Sendo, Abs, Abs₀ e Abs₁₀₀ os valores de absorbância das amostras teste, amostra tratada com solução salina e amostra tratada com água, respectivamente.

2.7. Microscopia de Força Atômica

2.7.1. Amostra de Sangue

Amostra de sangue humano (tipo O) foi coletada da veia periférica do braço de um voluntário jovem (28 anos), do sexo masculino e saudável. O sangue foi armazenado em tubo Vacutainer[®] (Shandong, China), contendo o anticoagulante heparina sódica. Os tratamentos consistiram de 1 tubo contendo 1ml sangue incubado com 1mg da proteína DREB1A liofilizada (10% de pureza), 1 tubo contendo 1ml de sangue sem a proteína (controle negativo) e 1 tubo contendo 900µl de sangue e 100µl de água (controle positivo). Os tubos foram incubados estufa a 37 °C durante 1 hora. Em seguida, 1µl de cada amostra foi espalhada sobre lamínulas de vidro circular (10 mm), seca em ar ambiente durante 5 min e fixadas com 20 µl de metanol por mais 5 min.

2.7.2 Análise de Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica foi realizada em ar sobre filmes de sangue utilizando o equipamento SPM-9600 (Shimadzu, Japan). As imagens foram obtidas em modo contato de força constante utilizando “cantilevers” de 200 μ m em forma de V (constante de mola própria de ≈ 0.15 N/m e frequência de ressonância de ≈ 24 kHz), com ponteira piramidal integrada (raio de curvatura < 20 nm). O movimento do escâner foi de 125 μ m nas direções XY e 7 μ m na direção Z. Todas as imagens foram adquiridas como 512X512 píxel em uma taxa de escaneamento de 1HZ. As imagens obtidas foram processadas pelo programa “Particle Analysis SPM-9600”. O processamento consistiu em um nivelamento plano automático Wt de superfície. Cem células individuais de cada tratamento foram manualmente segmentadas utilizando a função do “software” análise de marcação seguida pelas medições das células.

2.8.3. Análise de Dados

Os parâmetros processados pelo programa “Particle Analysis SPM-9600” (Shimadzu, Japan) foram submetidos à análise de estatística “One-way” ANOVA utilizando o programa “PAlaeontological Statistics – PAST” (ver. 2.01), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Expressão da Proteína DREB1A em Bactéria e Purificação

Para a investigação de atividade hemolítica e integridade de membrana de eritrócitos humanos, o fator de transcrição DREB1A/CBF3 de *A. thaliana* foi obtido *in vitro*, através de sistema heterólogo. De acordo com as análises de Bradford a proteína DREB1A semipurificada (10% de pureza) foi expressa em torno de 250 ug/L. Como visualizado em gel SDS-PAGE 12% e detectado por *Western blot*, a proteína heteróloga apresentou o tamanho esperado de aproximadamente 27,2 kDa (24,2kDa proteína natural DREB1A e 3kDa da cauda de histidina) e foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal a anti-HIS em sua região C-terminal composta por 6 resíduos de histidina (Figura 2).

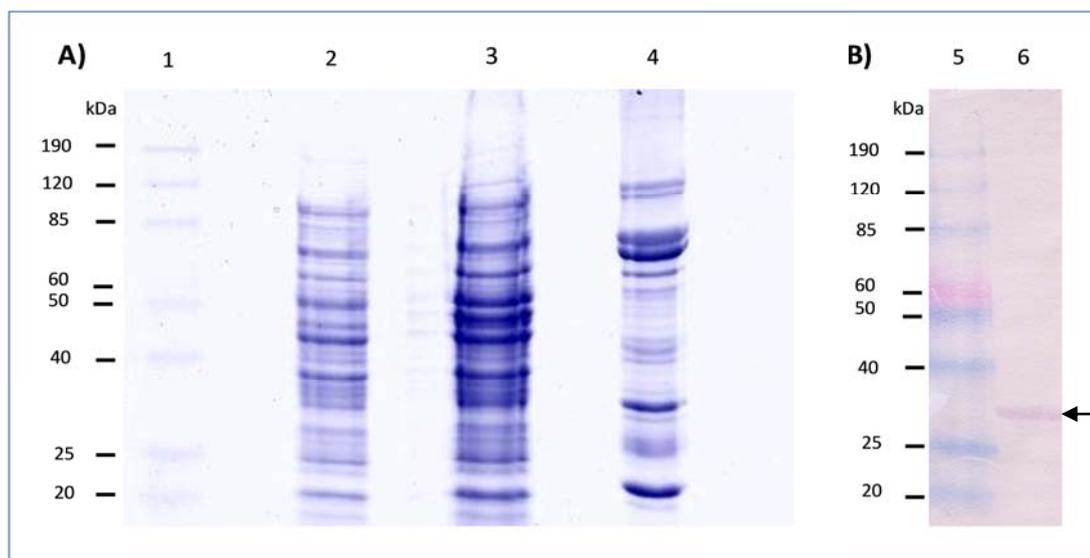


Figura 2. A) Gel SDS-PAGE 12%. Expressão e purificação da proteína DREB1A. 1 - Marcador pré-corado. 2 - Proteínas de células não induzidas. 3 - Proteína total de célula induzida com 0,5mM de IPTG. 4 - Proteína DREB1A semipurificada. B) Western Blot utilizando o anticorpo monoclonal Anti-HIS[®] AP conjugado. 5 - Marcador pré-corado. 6 - Proteína DREB1A.

3.2. Similaridade com Seqüências de Aminoácidos de Proteínas Antinutricionais, Tóxicas e/ou Alergênicas e Sítios de N-glicosilação

A análise *in silico* utilizando os bancos do NCBI, Uniprot-Swissprot, Uniprot-trEMBL e DDBJ - DAD mostrou que não há qualquer similaridade entre a seqüência completa da proteína DREB1A e seqüências de aminoácidos de proteínas antinutricionais, tóxicas e/ou alergênicas conhecidas (Tabela 1).

A proteína DREB1A mostrou-se similar apenas a proteínas de plantas que apresentam o domínio AP2, com exceção no banco PDB (Protein Data Bank) o qual também evidenciou < 25% de similaridade e < 6aa contíguos à seqüência da cadeia A da proteína carioferina de humanos “Beta2TRANSPORTIN”, acesso NCBI: 2 QMR_A.

Embora essa análise não ultrapasse os critérios estabelecidos pela FAO/WHO, a proteína “Beta2TRANSPORTIN” também foi avaliada quanto a sua estrutura tridimensional e os resultados mostraram que os resíduos similares à proteína DREB1A não formam um domínio, mantendo-se distantes mesmo em sua estrutura quaternária (Figura 3).

Tabela 1. Análise comparativa dos resultados de similaridade entre a proteína DREB1A e seqüências de aminoácidos de proteínas antinutricionais, tóxicas e/ou alergênicas, disponíveis em diferentes bancos de dados. *

Banco de dados	1 Sequência completa	2 Janela de leitura de 80aa	3 Domínio AP2	4 Similaridade com plantas	5 Similaridade com outras sp.	6 Homologia >35%	7 Homologia de 6aa	8 Homologia de 8aa
NR	+	+	+	+				
Refseq_Prot	+		+	+				
SwissProt	+		+	+				
Pat	+		+	+				
PDB	+		+	+	+			
Env_nr	+		+		+	+		
Uniprot-trEMBL	+		+	+				
DDBJ – DAD	+		+	+				
AllergenOnline	+	+						
SDAP	+	+		+			+	
Allergen Database	+	+		+			+	

*1. Em todos os bancos as análises de similaridades foram conduzidas utilizando-se a seqüência completa da proteína DREB1A; 2. Em quatro diferentes bancos a análise de similaridade foi realizada utilizando uma janela de leitura de 80 aa; 3, 4 e 5. Indicam os bancos de dados nos quais a proteína DREB1A apresentou homologia com o domínio AP2 e foi similar a plantas e/ou outras espécies; 6, 7 e 8. Indicam os bancos de dados onde a proteína DREB1A apresentou similaridade >35% e 6 ou 8aa contíguos.

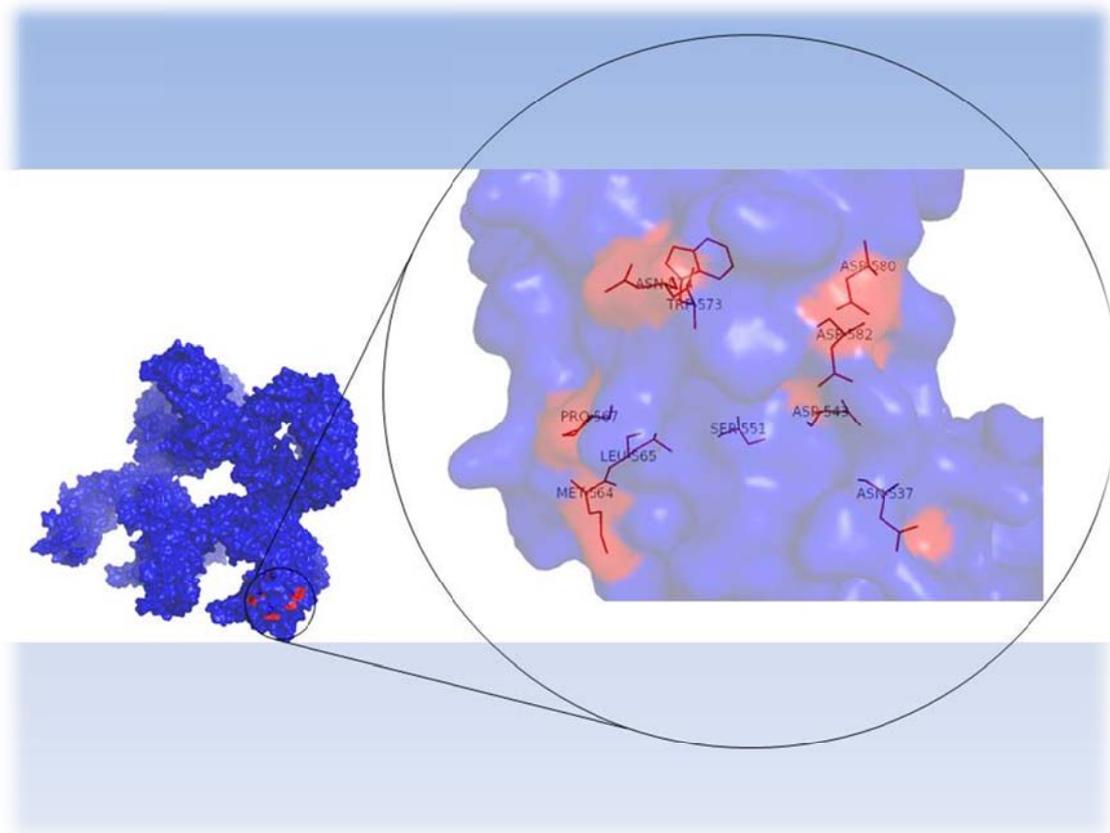


Figura 3. Estrutura tridimensional da proteína carioferina de humanos Beta2TRANSPORTIN (acesso NCBI: 2 QMR_A), visualizada no programa PyMOL 1.2. Os resíduos de aminoácidos similares à proteína DREB1A estão representados na estrutura pela cor vermelha. A ampliação desta região mostra que não há presença de mais de dois resíduos de aminoácidos contíguos, estando de acordo às normas estabelecidas pela FAO/WHO para a predição de alergenicidade.

A busca por similaridade no banco Env-nr (Environmental samples) também revelou que proteína DREB1A possui identidade >35% com seqüências de proteínas de metagenoma marinho (YOOSEPH *et al.*, 2007), entretanto, este alinhamento, apresentou um E-value não significativo, restringindo-se apenas ao domínio AP2. Esta similaridade pode ser relacionada com o modelo proposto por MAGNANI *et al.* (2004). O modelo atribui a origem evolutiva do domínio AP2, a uma endonuclease HNH que carrega o domínio AP2 e sua provável movimentação horizontal em plantas através de endossimbiose por cianobactérias, infecções virais, ou outros eventos laterais de transferência, levando a formação desta família gênica em plantas.

A predição de alergenicidade conduzida nos bancos de dados AllergenOnline, SDAP e Allergen Database for Food Safety, mostrou que não há identidade entre a proteína AtDREB1A e qualquer proteína alergênica conhecida utilizando o critério da FAO/WHO >35% de identidade e uma janela de leitura de 80 aminoácidos (Figura 4).

80mer Sliding Window Search Results	
Database	AllergenOnline Database v10.0 (January, 2010)
Input Query	>gi 3660548 dbj BAA33434.1 DREB1A [Arabidopsis thaliana] MNSFSAFSEMFGSDYESSVSSGGDYIPTLASSCPKKPAGRKKFRETRHPHYRGVRRRNSG KWVCEVREPNNKTRIWLTGFQTAEMAARAHDAALALRGRSACLNFADSAWRLRIPESTC AKDIQKAAAEALAFQDEMCDATTDYGFDMEEITLVEAIYTAEQSENAFYMHDEAMFEMPS LLANMAEGMLLPLPSVQWNHNHEVDGDDDDVSLWSY
Length	216
Number of 80 mers	137
Number of Sequences with hits	0
No Matches of Greater than 35% Identity Found	
AllergenOnline Database v10.0 (January, 2010)	

Figura 4. Predição de alergenicidade da proteína DREB1A, utilizando o critério da FAO/WHO >35% de identidade e uma janela de leitura de 80 aminoácidos, no banco de dados AllergenOnline.

Entretanto, adotando como critério a identidade de 6 aminoácidos, nos bancos de dados SDAP e Allergen Database for Food Safety, a predição resultou em identidade entre a proteína DREB1A e a proteína Ole e 9 de *Olea europaea*, acesso Q94G86 Uniprot (Figura 5). A proteína Ole e 9 é uma glucanase, presente no pólen de oliveira e pode promover alergia respiratória, quando o pólen é inalado (HUECAS *et al.*, 2001; PALOMARES *et al.*, 2006). Apesar da identidade, o alinhamento realizado no programa Clustal W mostrou que os 6aa contíguos estão presentes em diferentes regiões das seqüências de DREB1A e Ole e 9 e, que estas proteínas apresentam um baixo “score” em relação a sua similaridade (Figura 6).

Allergen Database for Food Safety

Top
Logout
Personal Info
Allergen Search
Name
Category
Keyword
Sequence Search

Allergenicity Prediction : FAO/WHO Method

Exact wordmatch result

Match	Description (from UniProt)	No of exact Wordmatch	Detailed result
ADFS Q94G86.txt Ole e 9	SubName: Full=Beta-1,3-glucanase-like protein;	1	show result

```

# Aligned sequences: 2
# 1: DREB1A
# 2: Q94G86#Ole e 9# #SubName: Full=Beta-1,3-glucanase-like protein;
# Matrix: EBLOSUM62
#
# Length: 6
# Identity: 6/6 (100.0%)
# Similarity: 6/6 (100.0%)
# Gaps: 0/6 ( 0.0%)
# Score: 6
#
#
#-----
DREB1A      -> 26 IPTLAS  31
              |||||
Q94G86#Ole  88 IPTLAS  93
  
```

Figura 5. Predição de alergenicidade da proteína DREB1A no banco de dados Allergen Database for Food Safety. O critério da FAO/WHO de 6aa contíguos evidencia identidade com proteína alergênica Ole e 9.

```

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

gi|3660548|DREB1A      -----MNSFSAFSEMFGSDYESSVSSGG----DYIPTLASSC----- 33
Q94G86#Ole            MAANVQTSLLFLVFLLLQNIFYSANSQSFLGVNYGQLSDNLPQLQATVNLKSTTIQKVR 60
                        : * :.:.:.: : * :. . * :*: * : :

gi|3660548|DREB1A      --PKKPAGRKKFRETRHPIYRGVRRRNSGKRWCEVREPNKKTR-IWLGFOTAEMAARAH 90
Q94G86#Ole            LFGAEPVAVIKAFANTGVEIVIGFDNGDIPTLASNPNVASQFVKSNVMSFYPPASNIIAIV 120
                        :** * * * * * * . . : . . . . . . . . : . . : : : : * :

gi|3660548|DREB1A      DVAALALRGRSACLNFADSAWRLR--IPESTCAKDIQKAAEAALAFQDEMCDAITDYGF 148
Q94G86#Ole            GNEVLTSGDQKLISQLLFPAMQNVQNALNAASLGKVKVSTVHAMAVLSQSYPPSSGVFNP 180
                        . .*: . . : : : : : : . . : : : : * . . . . : : : .

gi|3660548|DREB1A      DMEETLVEAIYTAEQSENAFYMHDEAMFEMP----- 179
Q94G86#Ole            GLGDTMKALLQFQSANDAPFMISPYFYFAYKNQPTPDTLAFCLFQPNAGQVDSGNHGKYT 240
                        . : *: : . . : . * : . *

gi|3660548|DREB1A      -----SLLANMAEGMLLPLPSVQWNHNHEVD----- 205
Q94G86#Ole            NMFDAQVDAVHSALNAMGFKDIEIVVAETGWPHGGDSNEVGPSLDNAKAYVGNLINHLKS 300
                        :* * :.: : : . . . * * . : :

gi|3660548|DREB1A      -----GDDDDVSLWSY----- 216
Q94G86#Ole            KVGTPPLMPGKSIDTYLFSLYDEDKKTGASSEKYFGLFKPDGSTTYDVGLLKNTQNPTTPA 360
                        *.. * . * : *

gi|3660548|DREB1A      -----
Q94G86#Ole            TPPTPKAAGSWCVKPGVSDDOLTGNINYACGQIDCGPIIOGGACFEPNTVKAHAAYV 420

gi|3660548|DREB1A      -----
Q94G86#Ole            MNLYYQSAGRNSWNCDFSOTATLLTNTNPSYGACNFPSGSN 460

```

Figura 6. Alinhamento entre seqüências da proteína DREB1A e Ole e 9 utilizando o programa ClustalW. A seqüência de 6aa contíguos IPTLAS, está presente em diferentes regiões das seqüências. A região do domínio AP2 da proteína DREB1A está sublinhada em vermelho e as regiões de epítipo IgE e IgG da proteína Ole e 9 estão sublinhadas em azul e verde, respectivamente.

As informações disponíveis sobre os epítomos da proteína Ole e 9 mostram que a seqüência IPTLAS não está presente nestas regiões (TREVIÑO *et al.*, 2008) (Figura 7). De acordo com o trabalho descrito por TREVIÑO *et al.* (2008) esta seqüência também não está presente em regiões de epítomos IgG e IgE (Figura 6). Em DREB1A esta seqüência está presente na região N-terminal e não participa do domínio AP2 (LIU *et al.*, 1998; SAKUMA *et al.*, 2002) (Figura 6).

< Epitope Information (1) >						
Pubmed	18096638					
Uniprot Acc.	Q94G86					
Title	Solution structure of the C-terminal domain of Ole e 9, a major allergen of olive pollen.					
Author	Trevino MA, Palomares O, Castrillo I, Villalba M, Rodriguez R, Rico M, Santoro J, Bruix M.					
Journal	Protein Sci. 2008 Feb;17(2):371-6. Epub 2007 Dec 20.					
Method	Spots					
No.	Epitope Sequences	Blast Search	Start	End	Description	Type
1	ATPTPT	Epitope / Protein	360	365	-	Linear Epitope
2	WCVPKPGVSD	Epitope / Protein	372	381	-	Linear Epitope
3	PIQPGGACFE	Epitope / Protein	400	409	-	Linear Epitope
4	RNSWNCD	Epitope / Protein	430	436	-	Linear Epitope

Figura 7. Seqüências de aminoácidos presentes nos epítomos da proteína Ole e 9. A seqüência IPTLAS encontrada na proteína DREB1A, não está presente nestas regiões de epítomos.

Ampliando-se o critério de busca para 8aa contíguos nos três diferentes bancos de dados, os resultados não evidenciaram qualquer similaridade entre a proteína DREB1A e Ole e 9, assim como, a outras seqüências de alérgenos conhecidos. Uma busca realizada no banco de dados NR utilizando apenas a seqüência IPTLAS, mostrou que estes resíduos de aminoácidos não são similares apenas a proteína DREB1A, mas estão presentes em diversas proteínas com funções biológicas variadas e encontradas em diferentes organismos, incluindo seqüências de soja (*Glycine max*).

A busca por sítios de N-glicosilação, utilizando o programa NetNGlyc 1.0 Server, também mostrou que não há sítios de N-glicosilação presentes na seqüência da proteína DREB1A (Figura 8).

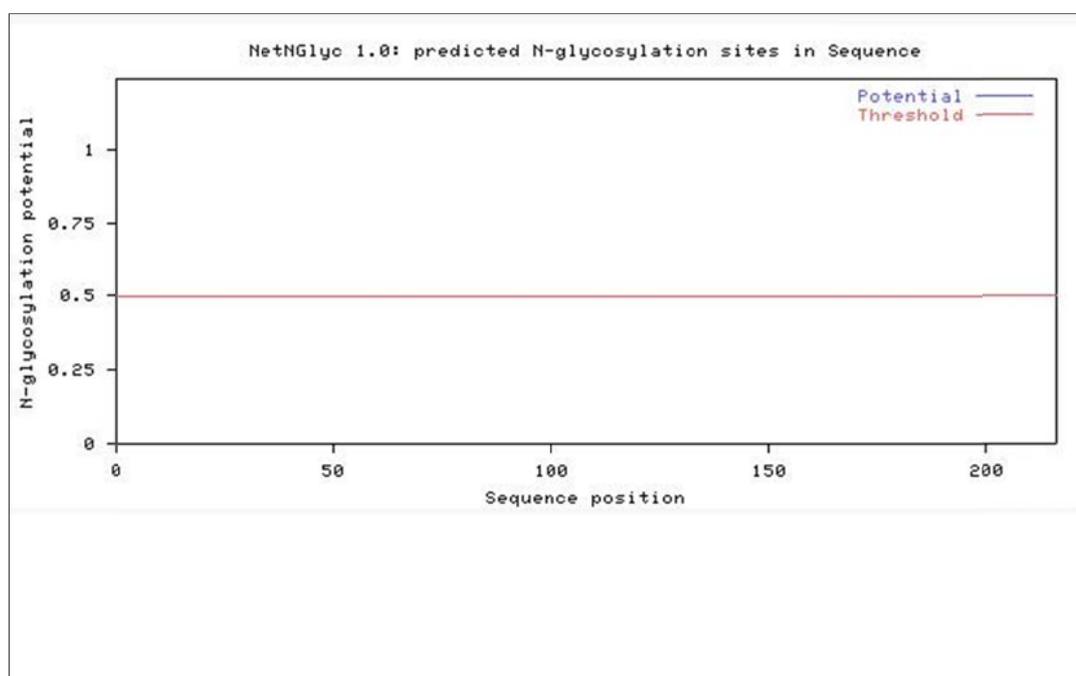


Figura 8. Busca por sítios de sítios de N-glicosilação na proteína DREB1A, utilizando o programa NetNGlyc 1.0 Server.

3.3. Ensaio de Atividade Hemolítica

A investigação da atividade hemolítica da proteína DREB1A mostrou que a concentração capaz de causar 50% de hemólise dos eritrócitos é maior que 100µg/ml. Como mostrado na Tabela 2 às porcentagens ficaram próximas ao controle negativo (< 0,2%), não causando hemólise nas diferentes concentrações testadas em eritrócitos humanos.

Tabela 2. Atividade hemolítica da proteína DREB1A em diferentes concentrações. A concentração é dada em relação a 10% de pureza da proteína DREB1A presente no produto de semipurificação.*

Diluições (v:v)	Concentração (µg/mL)	Sangue Total (% hemólise)	Sangue 1% (% hemólise)
* Controle -	0	0	0
1:1	100	0,09	0,07
1:2	50	0,12	0,20
1:4	25	0,15	0,01
1:8	12,5	0,11	0
1:16	6,25	0	0,10
1:32	3,12	0,05	0,02
1:64	1,56	0,04	0,13
1:128	0,78	0,08	0,01
1:256	0,39	0,08	0,04
* Controle +	H ₂ O	100	100

*Controle negativo: Suspensão de células 1% ou sangue total diluídos em solução salina.

*Controle positivo: Suspensão de células 1% ou sangue total diluídos em água destilada.

3.4. Microscopia de Força Atômica

A visualização e mensuração de vários parâmetros da superfície celular de eritrócitos humanos por microscopia de força atômica, em resposta a interação com a proteína DREB1A confirmaram que a proteína não causou danos às células em uma concentração de 100ug/mL nas condições experimentais aplicadas (Figura 9). Os parâmetros selecionados para a avaliação topográfica da superfície celular mostraram que na presença da proteína DREB1A os eritrócitos permaneceram inalterados quando comparados ao controle negativo, mantendo sua forma discóide e bicôncava (Figura 10). Já as células do controle positivo apresentaram deformações na superfície celular e medidas alteradas e superiores em todas as avaliações, indicando aumento da pressão osmótica intracelular na presença de meio hipotônico.

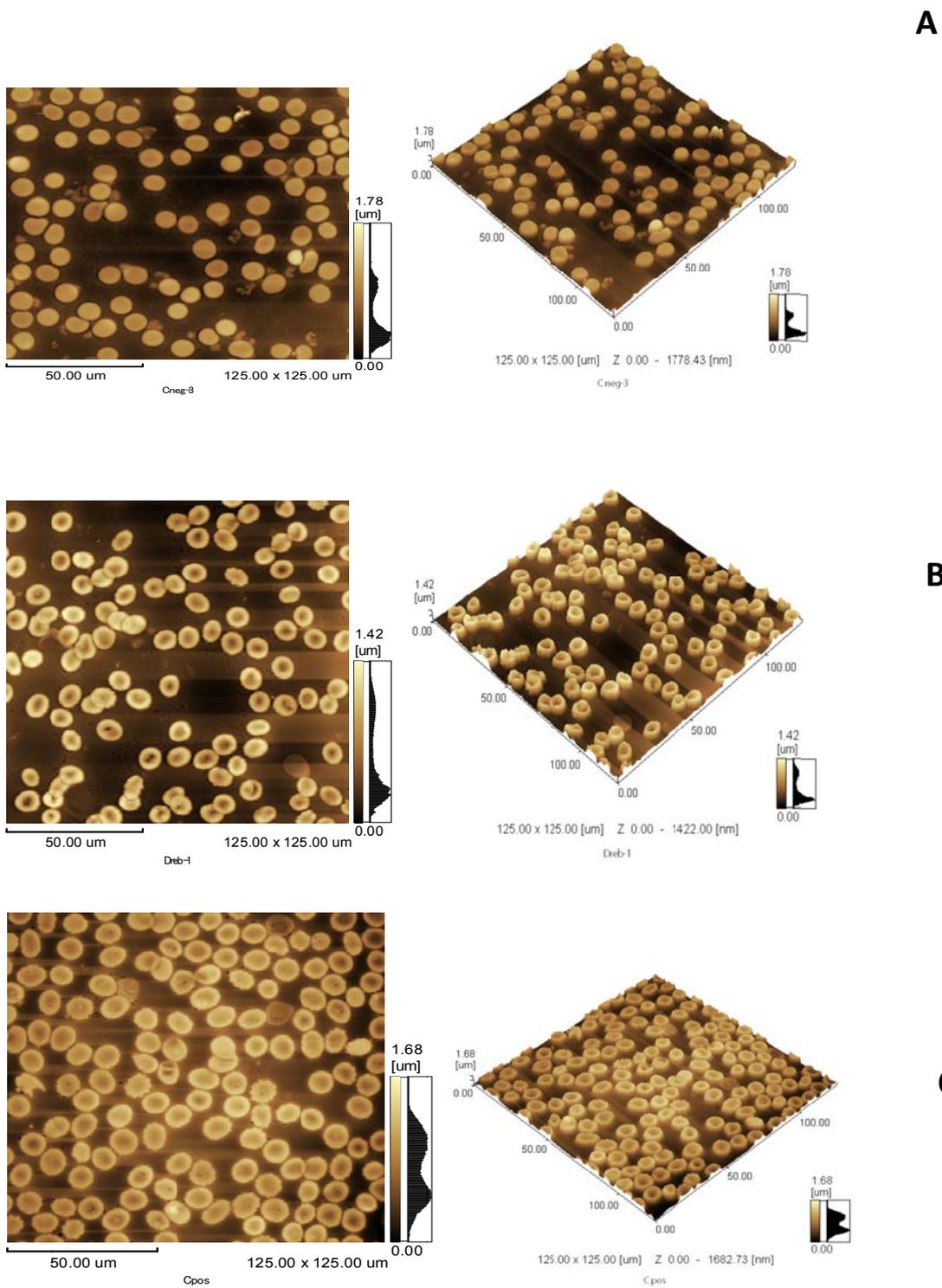


Figura 9. Imagens em 2D e 3D (125x125 μ m) de eritrócitos humano por microscopia de força atômica. A- Filme de sangue não tratado (controle negativo). B- Filme de sangue tratado com a proteína DREB1A. C- Filme de sangue tratado com água (controle positivo).

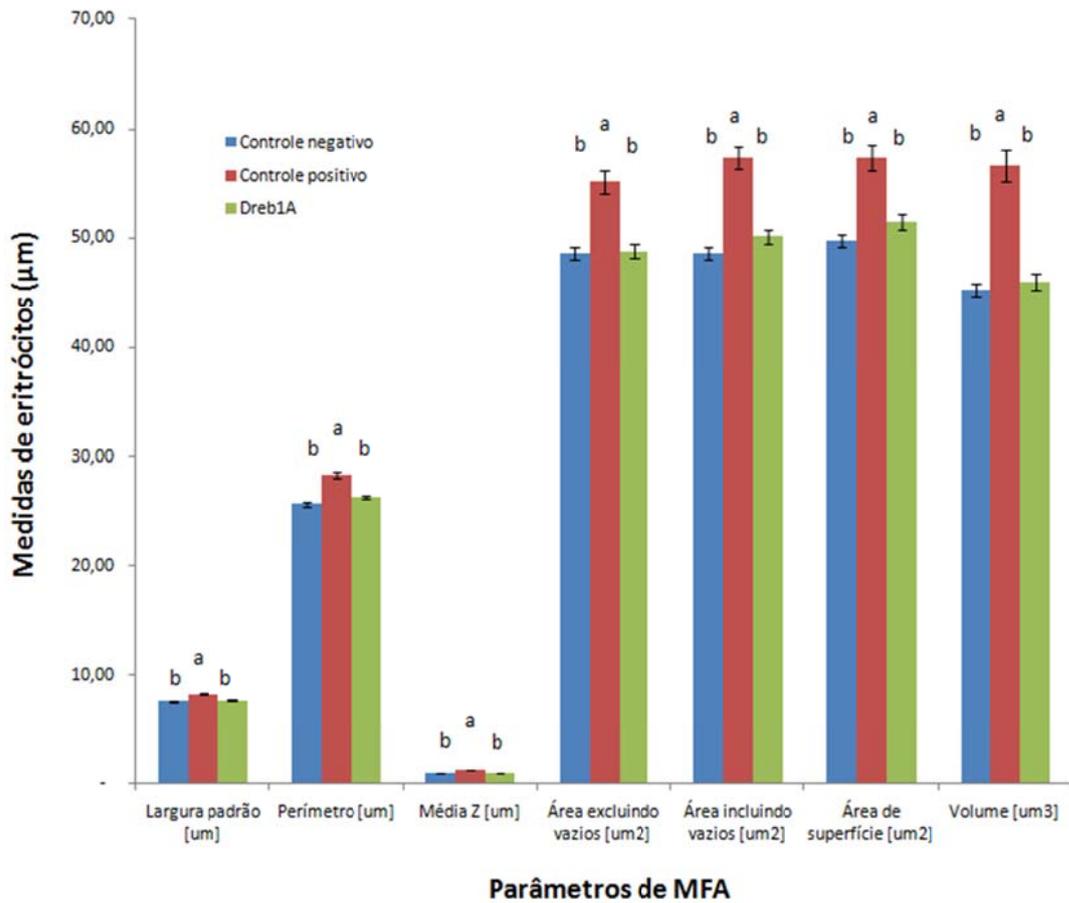


Figura 10. Parâmetros unidimensional, bidimensional e tridimensional da morfologia de eritrócitos avaliados por microscopia de força atômica.

4. DISCUSSÃO

A mais de uma década alimentos derivados da biotecnologia estão presentes no mercado (ISAAA, 2009) mostrando-se seguros a saúde humana de acordo com as regulamentações propostas pelo CODEX ALIMENTARUS (2009). Características de resistência a insetos e a herbicidas já foram introduzidas com sucesso em cultivares de interesse agrícola, porém, devido à demanda crescente por alimentos e os impactos gerados pelas mudanças climáticas, novas características são desejadas para a aplicação em programas de melhoramento, como proteínas envolvidas em resposta a estresses ambientais. Um grande interesse tem-se voltado ao fator de transcrição DREB1A, frente os resultados de tolerância a seca apresentado por diferentes espécies transgênicas, entretanto, para a introdução desta proteína em cultivares comerciais, faz-se necessário a obtenção de evidências que minimizem as dúvidas quanto ao seu potencial alergênico.

O amplo conhecimento sobre a função e o modo de ação da proteína DREB1A/CBF3 de *A. thaliana* permitiu uma avaliação consistente em torno de sua segurança conforme recomendado pela FAO/WHO. Seu domínio altamente conservado presente em diferentes espécies vegetais (KIZIS *et al.*, 2001; HAO *et al.*, 2002; ANDEANI *et al.*, 2009) garante que sua ligação seja específica ao elemento de regulação cis-atuante (DRE) presente na região promotora de genes em resposta a estresses ambientais. A análise estrutural do domínio ERF/AP2 (ALLEN *et al.*, 1998) mostra que uma valina presente na décima quarta posição (SAKUMA *et al.*, 2002), é o resíduo de aminoácido fundamental para a ligação da proteína AtDREB1A a seqüência core A/GCCGAC (SAKUMA *et al.*, 2006;

MARUYAMA *et al.*, 2009). O alto grau de conservação deste domínio, também permitiu que seqüências homólogas a esta proteína fossem isoladas em diversas espécies agroalimentares como, cevada (CHOI *et al.*; 2002), arroz (DUBOUZET *et al.*, 2003), tomate (ZHANG *et al.*, 2004), milho (QIN *et al.*, 2004), soja (LI *et al.*, 2005), uva (XIAO *et al.*, 2006) e trigo (BADAWI *et al.*, 2007), e o histórico de consumo desses alimentos não apresenta relatos de alergenicidade relacionados a proteínas que possuem o domínio AP2 (CHARDIN *et al.*, 2003).

Uma importante evidência *in silico* é que a proteína DREB1A de *A. thaliana* não possui similaridade com seqüências de aminoácidos de proteínas antinutricionais, tóxicas e/ou alergênicas. A busca por epítomos lineares utilizando oito aminoácidos contíguos também mostrou que não há similaridade entre a proteína AtDREB1A e alérgenos conhecidos. Em adição, sítios de N-glicosilação não foram identificados, uma característica relevante, desde que a presença de N-glicanas em proteínas alergênicas tem sido relatada como determinante para a ligação de IgEs durante o processo de resposta alérgica imediata ou hipersensibilidade do tipo I (ALTMANN, 2007).

Quanto a similaridade entre a proteína DREB1A e Ole e 9, a redução da busca por epítomos para 6 aminoácidos, não apresentou um resultado biologicamente significativo, sendo apenas um falso positivo. De acordo com HILEMAN *et al.* (2002) este critério pode levar a uma superestimação de potencial alergênico devido à alta taxa de similaridade e rejeição de proteínas benéficas não alergênicas. Em seu trabalho, utilizando seis seqüências de endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (inseticidas), três seqüências de proteínas alimentares não alergênicas e 50 proteínas de milho selecionadas aleatoriamente, a busca por

epítomos utilizando 6 aminoácidos contíguos mostrou que este critério não estabelece uma margem de segurança para a predição de alergenicidade. O Codex Alimentarius (2004), recomenda que o tamanho da seqüência para a busca de epítomos lineares deve ser baseado em um argumento científico justificável a fim de minimizar o potencial para resultados falso negativo ou falso positivo, de forma que os procedimentos de avaliação produzam resultados biologicamente significativos.

Outro aspecto relevante na abordagem de segurança de novas proteínas candidatas é a avaliação de seu potencial efeito tóxico (EFSA, 2006; DELANEY *et al.*, 2008; CODEX ALIMENTARUS, 2009). Um método simples amplamente empregado para a avaliação da interação membranas - proteínas citotóxicas é o teste de hemólise. A liberação de hemoglobina por materiais ou substâncias desconhecidas possibilita quantificar os danos causados a membrana dos eritrócitos, uma das primeiras células do sistema sanguíneo a entrarem em contato com materiais ou substâncias exógenas (SATO *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 2010).

A investigação de atividade hemolítica da proteína DREB1A produzida *in vitro* contra células de sangue humano mostrou que não há presença desta propriedade em nenhum nível, principalmente em comparação a outras proteínas hemolíticas descritas na literatura (SINGH & KAUR, 2008). O ensaio de hemólise convencional, mostrado na Tabela 2, revela que a proteína DREB1A na concentração de 100µg/mL não possui efeito hematológico, visto que a concentração de proteína utilizada é altamente superior as concentrações de proteínas transgênicas expressas em plantas GM, as quais variam em torno de

nanogramas de acordo com o tecido vegetal analisado (HARPER & STEWART, 2002; BAKHSH *et al.*, 2009).

Em uma etapa adicional, a análise de microscopia de força atômica também foi aplicada na avaliação da hemólise e morfologia dos eritrócitos tratados com a proteína *AtDREB1A*. Os resultados de MFA não só confirmaram que *AtDREB1A* não possui atividade hemolítica, como indicado pela análise convencional, mas forneceu uma avaliação refinada da integridade morfológica dos eritrócitos após a exposição a proteína, sugerindo que a proteína *AtDREB1A* não associa-se a membrana dos eritrócitos de forma a danificar funções da célula ou sua arquitetura geral. Além de não requerer muito processamento e quantidade de amostra, o procedimento de MFA tem sido incluído como uma etapa mais refinada no controle dos métodos convencionais e na obtenção de dados mais precisos sobre as propriedades físicas básicas e a topografia de eritrócitos humanos, assim como em células cancerígenas (HEKELE *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2010).

Os dados obtidos nesse trabalho sugerem que não há um risco associado ao consumo da proteína *AtDREB1A*. Em uma abordagem de avaliação com foco na primeira etapa de acordo com o proposto pela ILSI, conclui-se que a proteína *AtDREB1A* não possui qualquer característica associada a proteínas antinutricionais, tóxicas ou alergênicas. A ausência de atividade hemolítica em eritrócitos humanos contribui para atestar seu modo de ação promotor-específico e isenta seu potencial efeito de citotóxico.

Para uma avaliação completa, análises de digestibilidade *in vitro*, estabilidade térmica e a extremos de pH também serão conduzidas aumentando ainda mais a relevância desses resultados e determinando assim sua segurança. O conhecimento obtido apenas na primeira etapa normalmente promove informações suficientes para determinar se proteínas como as de tolerância a seca, seriam ou não prováveis fontes de efeitos adversos. Conseqüentemente, estudos realizados na segunda etapa não seriam necessários para confirmar sua segurança.

5. REFERÊNCIAS

ALLEN, M. D.; YAMASAKI, K.; OHME-TAKAGI, M.; TATENO, M.; SUZUKI, M. A novel mode of DNA recognition by a beta sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *EMBO J.*, 17: 5484–5496, 1998.

ALTMANN, F. The Role of Protein Glycosylation in Allergy. *Int Arch Allergy Immunol.*, 142: 99–115, 2007.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25: 3389–3402, 1997.

ANDEANI, J. K.; MOHSENZADEH, S.; MOHABATKAR, H. Isolation and Characterization of Partial DREB Gene from Four Iranian *Triticum aestivum* Cultivars. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5(5): 561-566, 2009.

BADAWI, M.; DANYLUK, J.; BOUCHO, B.; HOUDE, M.; SARHAN, F. The *CBF* gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal *CBFs*. *Mol Genet Genomics*, 277: 533–554, 2007.

BAKSH, A.; RAO, A. Q.; SHAHID, A. A.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. Camv 35s Is a Developmental Promoter Being Temporal and Spatial in Expression Pattern of Insecticidal Genes (Cry1ac & Cry2a) in Cotton. *Research Journal of Cell and Molecular Biology*, 3(1): 56-62, 2009.

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

BERNHEIMER, A. W. Assay of hemolytic toxins. *Methods Enzimol.*, 165: 213-217, 1988.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254, 1976.

CHARDIN, H.; MAYER, C.; SÉNÉCHAL, H.; WAL, J. M.; PONCET, P.; DESVAUX, F. X.; PELTRE, G. Lipid Transfer Protein 1 Is a Possible Allergen in *Arabidopsis thaliana*. *Int Arch Allergy Immunol*, 131: 85-90, 2003.

CHOI, D.W.; RODRIGUEZ, E. M.; CLOSE, T. J. Barley *Cbf3* gene identification, expression pattern and map location. *Plant Physiol.*, 129: 1781-1787, 2002.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Foods Derived from Biotechnology. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organisation of the UN WHO, Rome, Italy, 2004.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Foods Derived from Biotechnology. Second Edition. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rome, Italy, 2009.

DELANEY, B.; ASTWOOD, J. D.; CUNNY, H.; CONN, R. E.; HEROUET-GUICHENEY, C.; MACINTOSH, S.; MEYER, L. S.; PRIVALLE, L.; GAO, Y.; MATTSSON, J.; LEVINE, M.; ILSI INTERNATIONAL FOOD BIOTECHNOLOGY. Committee Task Force on Protein Safety Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. *Food and Chemical Toxicology*, 46: S71–S97, 2008.

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

EFSA. Scientific Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Scientific Opinion on Guidance for the risk assessment of genetically modified plants used for non-food or non-feed purposes, on request of EFSA. EFSA Journal 1164. [42 p.], 2009.

EFSA. Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. EFSA J. 9: 1–100, 2006.

FAO/WHO. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology – Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods, 22–25, Rome, Italy, p. 1–27, 2001.

GILMOUR, S. J.; ZARKA, D.G.; STOCKINGER, E. J.; SALAZAR, M. P.; HOUGHTON, J. M.; THOMASHOW, M. F. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J.*, 16: 433–442, 1998.

HAO, D.; YAMASAKI, K.; SARAI, A.; OHME-TAKAGI, M. Determinants in the sequence specific binding of two plant transcription factors, CBF1 and NtERF2, to the DRE and GCC motifs. *Biochemistry*, 41: 4202–4208, 2002.

HEKELE, O.; GOESSELSBERGER, C. G.; GEBESHUBER, I. C. Nanodiagnosics performed on human red blood cells with atomic force microscopy. *Materials Science and Technology*, 24(9): 1162–1164, 2008.

HEROUET-GUICHENEY, C.; Rouquié, D.; Freyssinet, M.; Currier, T.; Martone, A.; Zhou, J.; Bates, E. E. M.; Ferullo, J. M.; Hendrickx, K.; Rouan, D. Safety evaluation of the double mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 54: 143–153, 2009.

HARPER, B. K; STEWART, J. R. C. N. Patterns of green fluorescent protein expression in transgenic plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 18: 141a-141i, 2002.

HILEMAN, R. E.; SILVANOVICHA, A.; GOODMAN, R. E.; RICEA, E. A.; HOLLESCHAKA, G.; ASTWOODA, J. D.; HEFLEB, S. L. Bioinformatic Methods for Allergenicity Assessment Using a Comprehensive Allergen Database. *Int Arch Allergy Immunol.*, 128:280–291, 2002.

HUECAS, S; VILLALBA, M.; RODRÍGUEZ, R. Ole e 9, a Major Olive Pollen Allergen Is a 1,3-b-Glucanase, isolation, characterization, amino acid sequence, and tissue specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 27959–27966, 2001.

ISAAA. Pocket K No. 2 Plant Products of Biotechnology. 2009. Disponível em: <http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/>

KIZIS, D.; LUMBRERAS, V.; PAGÈS, M. Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS Letters*, 498(2-3): 187-189, 2001.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685, 1970.

LI, X-P.; TIAN, A-G.; LUO, G-Z.; GONG, Z-Z.; ZHANG, J-S.; CHEN, S-Y. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses. *Theor Appl Genet*, 110: 1355–1362, 2005.

LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 1391-1406, 1998.

MAGNANI, E.; SJÖLANDER, K; HAKE, S. From Endonucleases to Transcription Factors: Evolution of the AP2 DNA Binding Domain in Plants. *The Plant Cell*, 16: 2265–2277, 2004.

MARUYAMA, K.; SAKUMA, Y.; KASUGA, M.; ITO, Y.; SEKI, M.; GODA, H.; SHIMADA, Y.; YOSHIDA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *The Plant Journal*, 38(6): 982-993, 2004.

MARUYAMA, K.; TAKEDA, M.; KIDOKORO, S.; YAMADA, K.; SAKUMA, Y.; URANO, K.; FUJITA, M.; YOSHIWARA, K.; MATSUKURA, S.; MORISHITA, Y.; SASAKI, R.; SUZUKI, H.; SAITO, K.; SHIBATA, D.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. *Plant Physiol.*, 150(4): 1972-80, 2009.

MEINKE, D. W.; CHERRY, J. M.; DEAN, C.; ROUNSLEY, S. D.; KOORNNEEF, M. *Arabidopsis thaliana: A Model Plant for Genome Analysis. Science*, 282: 662-682, 1998.

MERKER, M. P.; LEVINE, L. A protein from the marine mollusc *Aplysia californica* that is hemolytic and stimulates arachidonic acid metabolism in cultured mammalian cells. *Toxicol.*, 24: 451-65, 1986.

PALOMARES, O.; BATANERO, E.; CANÃMERO, M.; VILLALBA, M.; RODRÍGUEZ R. Prophylactic intranasal treatment with fragments of 1,3- β -glucanase olive pollen allergen prevents airway inflammation in a murine model of type I allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 139: 175–180, 2006.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. *Quim. Nova*, 33(2): 421-430, 2010.

PELLEGRINESCHI, A.; RIBAUT, J. M.; TRETOWAN, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; HOISINTONG, D. Progress in the genetic engineering of wheat for water-limited conditions. *JIRCAS Working Report*, p. 55-60, 2002.

QIN, F.; YOH, S.; LI, J.; LIU, Q.; LI, YI-QIN; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Cloning and Functional Analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol.*, 45: 1042-1052, 2004.

SAKUMA, Y.; LIU, Q.; DUBOUZET, J. G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem. Biophys.*, 290: 998-1009, 2002.

SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional Analysis of an Arabidopsis Transcription Factor, DREB2A, Involved in Drought-Responsive Gene Expression. *The Plant Cell*, 18: 1292–1309, 2006.

SANGTAE, K.; SOLTIS, P. S.; WALL, K.; SOLTIS, D. E. Phylogeny and Domain Evolution in the APETALA2-like Gene Family. *Mol. Biol. Evol.*, 23(1):107–120, 2006.

SATO, Y.; YAMAKOSE, H.; SUZUKI, Y. Mechanism of Hypotonic Hemolysis of Human Erythrocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, 16: 506-512, 1993.

SINGH R.P.; KAUR G. Hemolytic activity of aqueous extract of *Livistona chinensis* fruits. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 553–556, 2008.

SWARBRECK, D.; WILKS, C.; LAMESCH, P.; BERARDINI, T. Z.; GARCIA-HERNANDEZ, M.; FOERSTER, H.; LI, D.; MEYER, T.; MULLER, R.; PLOETZ, L.; RADENBAUGH, A.; SINGH, S.; SWING, V.; TISSIER, C.; ZHANG, P.; HUALA, E. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Res.*, 36: D1009-D1014, 2008.

THEOLOGIS, A.; ECKER, J. R.; PALM, C. J.; FEDERSPIEL, N. A.; KAUL, S.; WHITE, O.; ALONSO, J.; ALTAFI, H.; ARAUJO, R.; BOWMAN, C. L. Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 14;408(6814): 816-20, 2000.

TREVINÑO, M. A.; PALOMARES, O.; CASTRILLO, I.; VILLALBA, M.; RODRÍGUEZ, R.; RICO, M.; SANTORO, J.; BRUIX, M. Solution structure of the C-terminal domain of Ole e 9; a major allergen of olive pollen. *Protein Science*, 17: 371–376, 2008.

WANG, W.; XIONG, W.; ZHU, Y.; XU, H.; YANG, X. Protective Effect of PEGylation Against Poly(amidoamine) Dendrimer-Induced Hemolysis of Human Red Blood Cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 93B: 59-64, 2010.

XIAO H.; SIDDIQUA M.; BRAYBROOK S.; NASSUTH A. Three grape CBF/DREB1 genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. *Plant, Cell and Environment*. 29, 1410–1421, 2006.

Xue-Ping, L.; Ai-Guo, T.; Guang-Zuo, L.; Zhi-Zhong, G.; Jin-Song, Z.; Shou-Yi, C. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses. *Theor Appl Genet*, 110: 1355–1362, 2005.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; KASUGA, M.; LIU, Q.; NAKASHIMA, K.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; NAKASHIMA, K.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; SHINWARI, Z. K.; SEKI, M.; SHINOZAKI K. Biological mechanisms of drought stress response. *JIRCAS Working Report*, p.1-8, 2002.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K; SHINOZAKI, K. Regulons in Abiotic-Stress-Responsive Gene Expression in Plants. In: *Molecular Breeding of Forage and Turf*. Doi 10.1007/978-0-387-79144-9_2, Springer Science + Business Media, LLC, 2009.

YOOSEPH, S.; SUTTON, G.; RUSCH, D. B.; HALPERN A. L.; WILLIAMSON S. J. The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: Expanding the universe of protein families. *PLoS Biol*, 5(3): e16. doi:10.1371/journal.pbio.0050016, 2007.

ZHANG, X.; FOWLER, S. G.; CHENG, H.; LOU, Y.; RHEE, S. Y.; STOCKINGER E. J.; THOMASHOW, M. F. Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold

response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant Arabidopsis. *Plant J.*, 39(6): 905-919, 2004.

Capítulo 2

**Improving Drought Stress Tolerance in Soybean by introduction of the
RD29:AtDREB1A/CBF3 construct**

BMC Biotechnology (2010). *Submitted.*

Improving Drought Stress Tolerance in Soybean by introduction of the *RD29:AtDREB1A/CBF3* construct

Magda A Beneventi^{1,5}, Kazuo Nakashima², Naoki Yamanaka², Eliseu Binneck³, José RB Farias³, Maria CN de Oliveira³, Norman Neumaier³, Ricardo Abdelnoor³, Francismar C Marcelino³, Silvana RR Marin³, Renata Fuganti³, Renata Stolf-Moreira³, Amanda AP Rolla⁵, Adriana M Polizel⁶, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki², Maria F Grossi-de-Sa⁷, Alexandre L Nepomuceno^{3*}

¹ *Department of Biotechnology, Rio Grande do Sul Federal University, Porto Alegre – RS, PC: 90040-060, Brazil*

² *Japan International Research Center for Agricultural Sciences/JIRCAS, Japan*

³ *Embrapa Soybean, Londrina – PR, PO BOX: 6001 PC: 86001-970, Brazil*

⁴ *Esalq- Escola Superior Agrícola Luis de Queiroz, Piracicaba – SP, PC: 13418-900, Brazil*

⁵ *Department of Genetic and Molecular Biology, Londrina State University, Londrina – PR, PC: 86051-990, Brazil*

⁶ *Department of Genetic and Crop Breeding, Maringá State University, Maringá – PR, PC: 87020-900, Brazil*

⁷ *Embrapa Cenargen, Brasília – DF, PO BOX: 02372 PC: 70770-900, Brazil*

[§]Corresponding author

Abstract

Background: Drought is one of the most serious abiotic stresses, resulting in substantial yield losses. Biotechnological tools provide the possibility of improving drought tolerance. Genetic engineering using the *Arabidopsis thaliana* transcription factor DREB1A/CBF3 controlled by the *Arabidopsis* stress-inducible promoter *RD29A* has been shown to improve drought tolerance in several species.

Results: We introduced the constructs *RD29A:AtDREB1A* or *RD29A:GUS* into soybean to determine if this strategy has the potential to improve drought tolerance. Twenty positive lines were obtained by bioballistic transformation, and transgene's stability of inheritance was confirmed. Histochemical and expression analyses confirmed induction of the *RD29A* promoter under dehydration conditions and showed that the *AtDREB1* gene was up-regulated. The expression levels of two soybean genes activated by DREB1A, *GmPip1* and *GmGols*, were analyzed by qPCR, and their regulation by the *AtDREB1A* protein in soybean was confirmed. On average, physiological parameters were superior in the transgenic lines compared to the isoline (BR16). Also, no significant anatomical differences were observed between transgenic and wild-type plants.

Conclusions: The combination of *A. thaliana* DREB1A transcription factor and the *RD29A* promoter was useful for maintaining physiological parameters such as net photosynthesis and photosynthetic efficiency at superior levels when compared to non-transformed plants. Thus, genetically modified (GM) plants were able to tolerate drought longer. Although field experiments should be conducted to check the impact of these responses on yield, there is a good indication that the strategy can improve drought tolerance in soybean.

Background

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] production plays a key role in the world economy. However, billions of dollars are lost yearly due to abiotic and biotic stresses on this crop. Among these, drought is one of the most serious causes of a yield loss. For example, during the 2003–2004 soybean crop seasons, the southern states of Brazil, which are responsible for 40% of national production, lost more than 20% of their production due to water deficits [1, 2]. Likewise, in the USA, the world's largest soybean producer, drought conditions in 2007 caused direct losses of US\$787.2 million and indirect losses to agribusiness estimated at US \$1.3 billion [3]. Among the strategies used to reduce yield losses, biotechnological methods, including genetic engineering, have been shown to be powerful tool that may lead to new approaches for improving crop tolerance to environmental stresses [4-8].

Plant responses to drought are regulated by a complex of genes that generate a variety of tolerance mechanisms [9, 10]. The complexity of the response makes it difficult to use classic breeding methods to develop tolerant varieties. An alternative strategy might be to use genetic engineering to modulate the expression of transcription factors involved in the regulation of several genes related to defenses against abiotic stress [5, 11]. Stress-inducible transcription factors are involved in ABA-dependent and independent regulatory mechanisms [12]. A *cis*-acting dehydration-responsive element (DRE) isolated from *Arabidopsis* is involved in ABA-independent gene expression under drought, low-temperature, and saline conditions [13-16]. DRE-binding proteins, such as DREB1A/CBF3 and DREB2A (DREB: dehydration-responsive element-binding protein; CBF: C-repeat-binding factor), are transcription factors that function in

stress-responsive gene expression [17,18]. Transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing *DREB1A/CBF3* or *DREB1B/CBF1* under control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter have shown strong tolerances to drought, high salinity, and freezing [17, 19, 20]. However, overexpression of *DREB1/CBF* also causes severe growth retardation under optimal growth conditions. To overcome the negative impacts on growth and development, the stress-inducible *RD29A* promoter, instead of the strong constitutive CaMV 35S promoter, has been used to control expression of *DREB1A* [20]. The stress-inducible overexpression of *DREB1A* delays plant death following withdrawal of irrigation in transgenic wheat [21], while the same strategy improves tolerance to salinity and low-temperature stresses in groundnut, potato and tobacco [4, 8, 22, 23]. (GM) plants over-expressing *DREB1* orthologs from rice and maize have also shown improved tolerance to drought, high-salt and low-temperature stresses [6, 7, 24]. The efficiency of stress-inducible over-expression has been demonstrated using the other stress-responsive promoters in conjunct with other transcription factors to improve abiotic stress tolerance in transgenic *A. thaliana* and rice [25, 26].

In this work, we introduced a construct that comprised the *Arabidopsis DREB1A* gene fused to the *Arabidopsis* stress-inducible *RD29A* promoter (*RD29A:AtDREB1A*) into soybean. We demonstrate that both the stress-inducible *RD29A* promoter and the *DREB1A* protein enhance water deficit tolerance in soybean.

Results

Soybean transformation

Constructions of the *GUS* reporter gene fused to the *RD29A* promoter (*RD29A:GUS*) and the *DREB1A* gene fused to the *RD29A* promoter (*RD29A:AtDREB1A*) were used to transform soybean plants [28, 29]. A total of 1,608 plants were evaluated by conventional PCR to confirm the presence of transgenes using sets of primers for the *RD29A:AtDREB1A* and *RD29A:GUS* constructs (Table 1, Figure 1). Twenty independent transgenic plant events containing *RD29A:AtDREB1A* were identified at the T₀ generation using different sets of primers. T₁ seeds were grown in the greenhouse for seed multiplication and segregation analysis (Table 2). The segregation of the *RD29A:AtDREB1A* construct in 10 transgenic events was tested; seven events showed Mendelian segregation by a χ^2 test ($p \leq 0.05$) (Table 3). T₂-generation plants were used for gene expression analysis and physiological characterization.

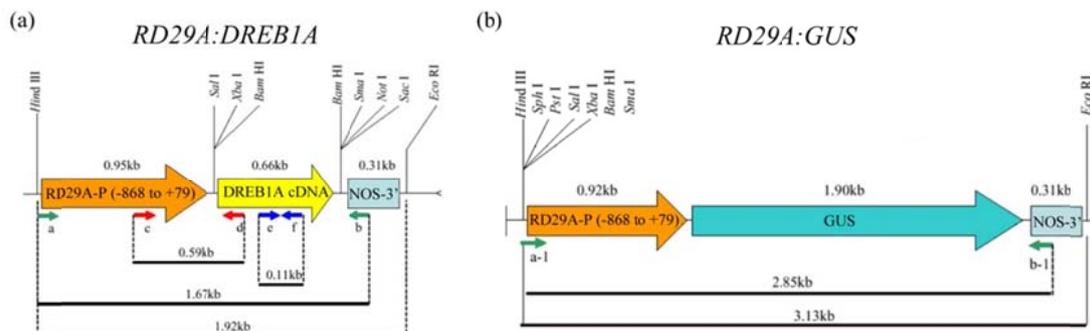


Figure 1 - Construction of *RD29A:DREB1A* and *RD29A:GUS* for soybean embryo transformation. The name of the primer pairs used to confirm positive events and the estimated fragment sizes are indicated in the figure.

Table 1 - PCR primers. Sequences and localization of primers used to identify *DREB1A*- and *GUS*-positive plants

Primers	Sequence 5'3	Localization of primer on Figure 01	Amplicon size
29AP5H-F	GGG AAG CTT GCC ATA GAT GCA ATT CAA TCA AAC T	primer a, a-1	1.67 kb (<i>DREB1A</i>)
NosTProx-R	GTT TGA ACG ATC GGG GAA AT	primer b, b-1	2.85kb (<i>GUS</i>)
Atrd29Dreb-F	CCA ATA GAC ATG GAC CGA CTA CT	primer c	0.59 kb
Atrd29Dreb-R	GTT CTC TAA CCT CAC AAA CCC ACT	primer d	
RTDreb-F	CGC TGA CTC GGC TTG GA	primer e	108 bp
RTDreb-R	GCA TCA CAC ATC TCA TCC TGA AAC	primer f	

Table 2 – Lines containing *RD29A:DREB1A* construct. Twenty genetically modified independent soybean lines transformed with the *RD29A:DREB1A* construct and the number of seeds produced (T_1) in the greenhouse

Transgenic line	Number of seed produced (T_1)
27C	8
31A	2
45A	376
58B	132
59B	625
61A	46
62A	2
63B	2
343	96
345A	550
382B	519
539A	48
890	42
1142B	3
1333A	23
1372A	12
1378B	10
3068	25
3069	6
3075	12

Table 3 – Segregation analysis on lines containing the *RD29A:AtDREB1A* construct. Segregation test of 10 independent positive events containing the *RD29A:DREB1A* construct

Transgenic lines	λ^2 values
27C	0.000
45A	121.12*
58B	3.3
59B	0.2
345A	124.12*
382B	0.12
890	94.231*
1142B	0.667
1333A	0.710
1378B	0.000

* Not a Mendelian segregation 3:1 of *AtDREB1A* gene

Analysis of *RD29A* promoter stress inductivity in soybean through GUS assays

To confirm the stress-inductivity of the *Arabidopsis RD29A* promoter in transgenic soybean leaf tissues, three T₁-generation independent lines containing the *rd29A:GUS* construct (lines P1234, P1251 and P1263A) were submitted to different periods of dehydration stress, after which histochemical GUS assays were performed. GUS activity in transgenic leaves confirmed induction of the *RD29A* promoter in soybean during dehydration (0 min to 210 min) (Figure 2). The activity of the stress-inducible *RD29A* promoter differed in each independent transformation event. When compared visually to the CaMV 35S constitutive promoter, the induction strength of the stress-inducible *RD29A* promoter was weaker in the three events.

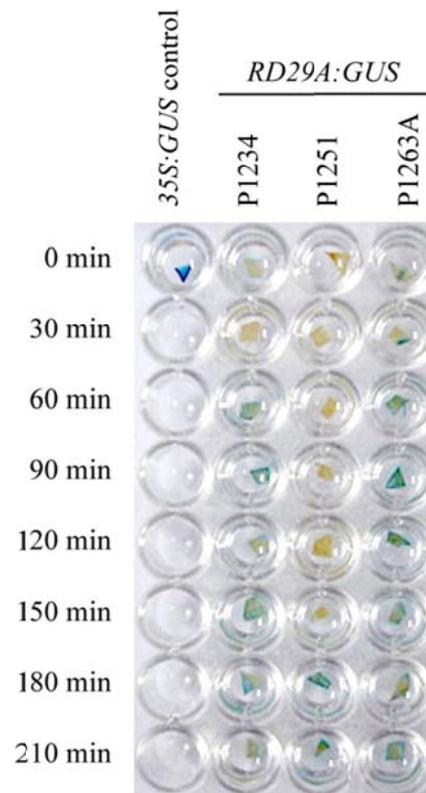


Figure 2 - Histochemical GUS assay. *GUS* gene expression shows *RD29A* promoter induction in leaf tissues under cellular dehydration. Samples were submitted to drying treatment from 0 to 210 min at 37°C.

Analysis of transgene copy number through Southern blot

Southern blot analysis revealed that P58 (T₂) and P1333 (T₂) events showed three and five locus insertions of the *RD29A:AtDREB1A* construct, respectively (Figure 3). The transgene stability in the P58 and P1333 events was confirmed because all PCR-tested plants in T₇ generation were positive (data not shown).

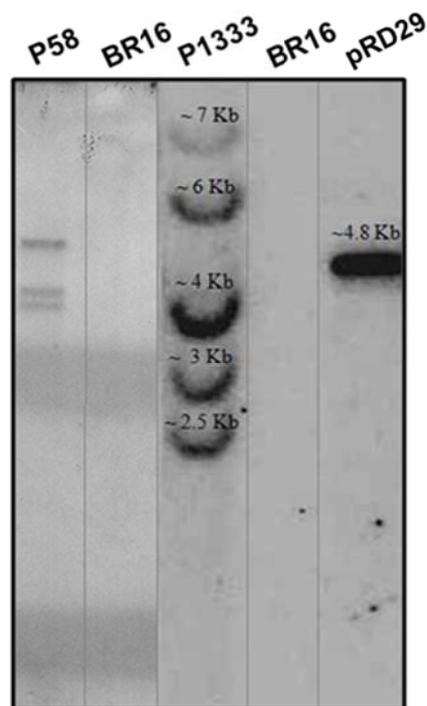


Figure 3 - Southern blot analyses. Number of transgene copies of the *RD29A:DREB1A* construct in P58 and P1333 T₂-generation plants. As a positive control, *RD29A:AtDREB1A* plasmids (4.8kb band) were digested with *HindIII*. Negative control: non-transformed isolate BR16 plants.

Analysis of *DREB1A* gene expression on transgenic events P58 and P1333 at the T₂ generation through RT-qPCR and physiological characterization

To verify and to quantify the induction of the *RD29A:AtDREB1A* construct in soybean during water deficit, quantitative PCR was performed. The induction of the transgene *AtDREB1A* in soybean was confirmed; the highest expression levels in P58 and P1333 occurred under dehydration (Figure 4). Line P58 showed approximately 7-fold more expression of *AtDREB1A* transcripts after 34 days of the stressed condition (5% GH; Gravimetric humidity) compared with unstressed P58 control (15% GH), which confirmed *RD29A* induction in soybean. Similar behavior was observed in line P1333, in which *DREB1A* expression after 34 days of stress was higher than in unstressed P1333 control. However, the induction ratio of *AtDREB1A* was similar in the P1333 lines with and without stress.

T₂-generation plants from lines P58 and P1333 were submitted to water deficit treatments. Physiological characterization of the control (15% GH) as well as moderately (5% GH) and severely (2.5% GH) stressed plants in the three repeated experiments showed that on average, net photosynthesis, photosynthetic efficiency, stomatal conductance and net transpiration were superior in the transgenic P58 lines compared to the control plants, most markedly after application of severe stress. Figure 5 shows that net photosynthesis in the GM plants, when the stressed plants reached 5% GH (from 12 to 41 days after stress started), was 7 to 105% higher than that of non-GM plants. After severe stress started (2.5% GH) (from 41 to 57 days after stress started), the superiority in net photosynthesis of the GM over the non-GM plants increased, ranging from 248 to 21%. Photosynthetic efficiency was also superior in the GM plants, ranging (at the severe stress) from 1.4 to 79.5% over the non-GM plants.

The photosynthetic rate, stomatal conductance, photosynthetic efficiency and net transpiration of P1333 plants were similar to those of BR16 in 15% GH. Only the photosynthetic rate and stomatal conductance were higher in transgenic plants compared with BR16 at 20 days after water stress of 5% GH (data not shown). No significant differences were observed on the other evaluation date.

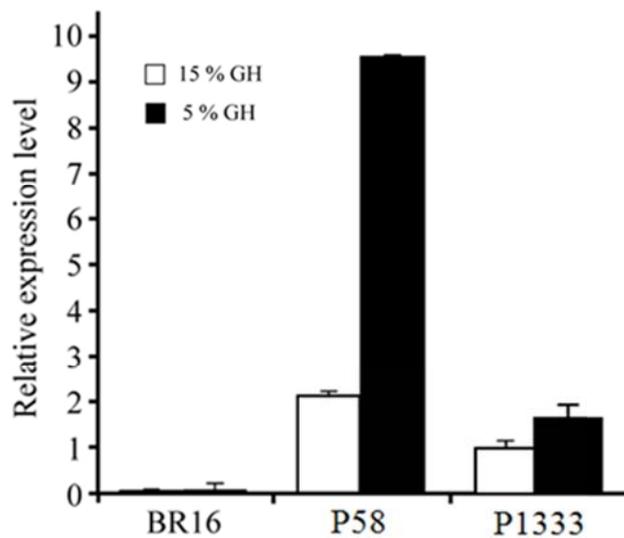


Figure 4 – *AtDREB1A* expression in soybean. *AtDREB1A* relative gene expression quantification obtained by RT-qPCR in P58 and P1333 T₂ soybean plants under water stress. Non-transformed isolate BR16 was used as negative control. mRNA was extracted on 34 days after stress started.

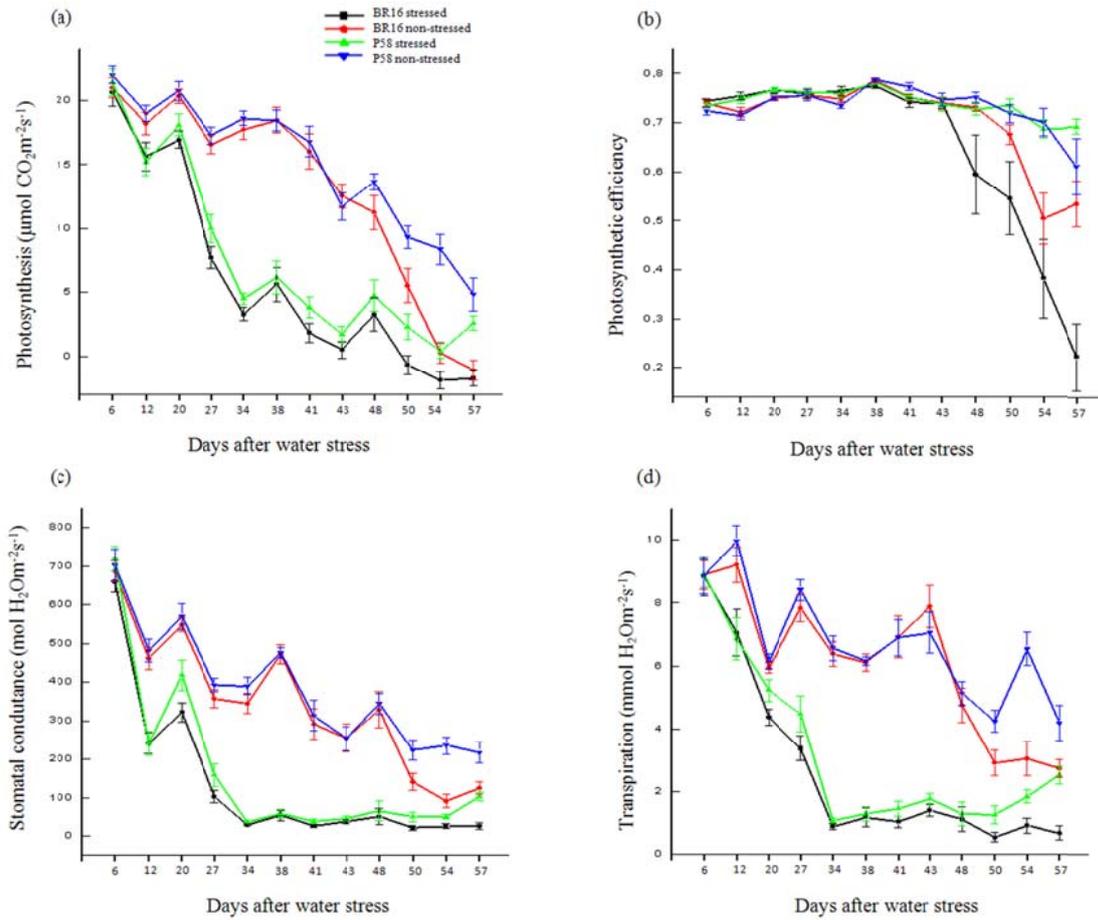


Figure 5 - Physiological parameters in P58 line at T₂-generation plants under water stress. Time-course changes in (a) net photosynthesis, (b) photosynthetic efficiency, (c) stomatal conductance and (d) net transpiration in transgenic P58 T₂-generation plants and control plants under water stress. When the standard error bars of the means do not coincide, there is significant difference between means (Tukey test, $p \leq 0.05$).

Molecular, morphological, anatomical and agronomic characterization

GmPip1 gene, which encodes an aquaporin, and *GmGolS* gene, which encodes galactinol synthase, are involved in the pathway activated by DREB proteins [49,50]. Gene expression analyses showed differences in the time and intensity of the expression of these genes between the P58 transgenic and non-transgenic lines of the T₂ generation. With regard to *GmPip1* gene expression, P58 stressed plants showed approximately 20- and 6-fold higher expression when compared to isoline BR16 non-stressed and stressed plants at 20 days of stress, respectively (Figure 6a). *GmGolS* at 20 days of stress showed expression levels 3- and 4.5-fold higher in P58 non-stressed and stressed samples, respectively, when compared to non-stressed isoline BR16 samples. After 34 days of treatment, no differential on *GmGolS* gene expression was detected in non-stressed transgenic P58; however, in stressed samples of isoline BR16 and P58 plants, expression increased 2.5- and 5-fold, respectively, when compared to the non-stressed BR16 isoline plants. After 41 days of treatment, P58 stressed and non-stressed plants, as well as BR16-stressed plants, showed 2-fold higher levels of *GmGolS* gene expression when compared to BR16 non-stressed plants (Figure 6b).

Morphological and anatomical traits indicated no significant differences between GM P58 plants and BR16 plants (Figure 7). No significant statistical differences were observed for the agronomical parameters analyzed (data not shown). As an example, Figure 8 shows number of pods/seeds, number of seeds and plant dry weight.

Wilting occurred more slowly in the P58 transgenic soybean plants when compared to BR16 isoline plants between 10:00h and 15:00h, during the hottest hours of the day when average temperatures were around 30±2°C in the greenhouse.

Senescence occurred later in the P58 line than in the BR16 isoline (Figure 9), suggesting that P58 plants had greater drought tolerance.

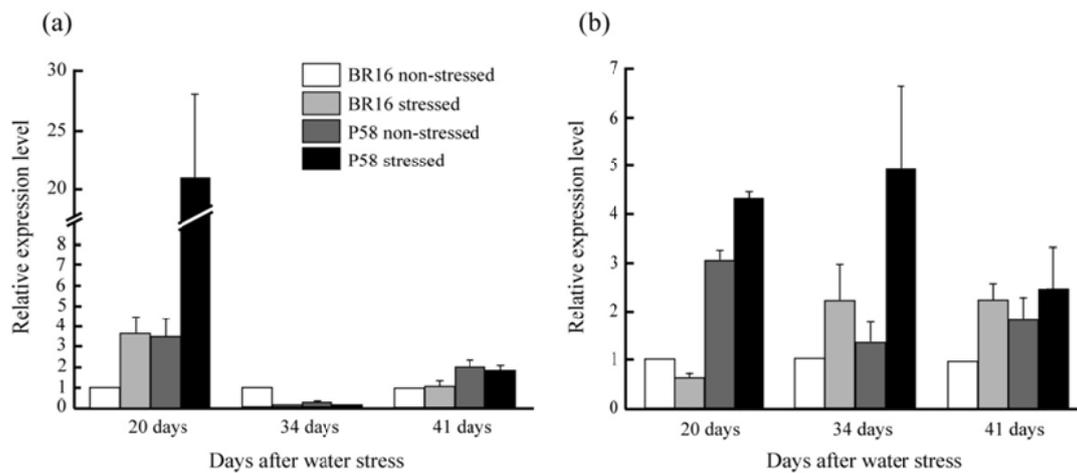


Figure 6 – Soybean drought-activated genes regulated by *AtDREB1A*. Expression level of (a) *GmPip1* and (b) *GmGols* at 20, 34 and 41 days after the initiation of water stress in the transgenic P58 and the non-transformed isoline BR16 plants under stressed and non-stressed treatments.

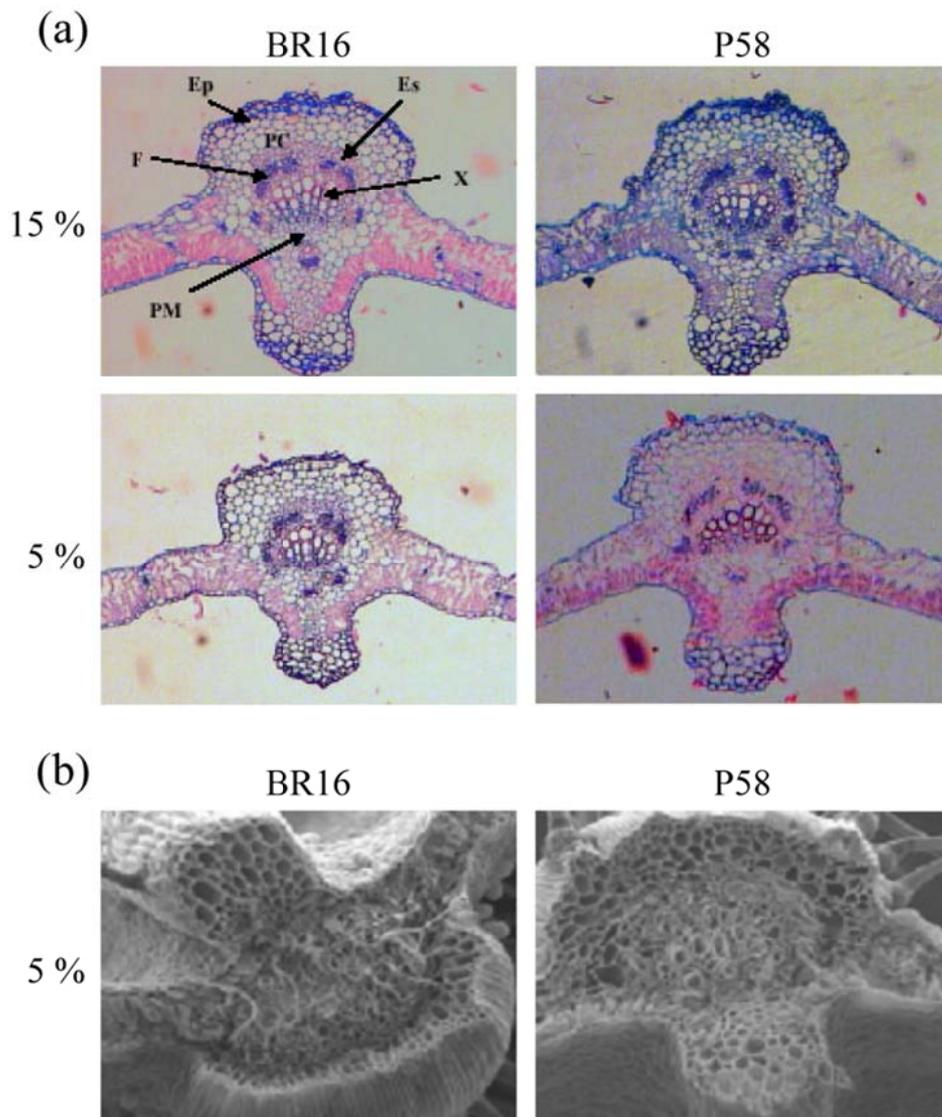


Figure 7 - Anatomical evaluation of soybean leaflets under drought stress treatment. Microscopy of central vascular bundle in leaflets of the control isoline BR16 and the transgenic P58 event. (a) Optical microscopy of the central vascular bundle in leaflets of the control isoline BR16 and transgenic P58 event subjected to two moisture conditions in soil: (top pictures) BR16 and P58 at 15% GH, (bottom pictures) BR16 and P58 at 5% GH for 20 days,. Ep: Epidermis, Es: sclerenchyma, PC: cortical parenchyma, F: phloem, X: xylem, PM: medullar parenchyma. (b) Scanning electromicrograph of central veins on *Glycine max* leaflets. Non-transformed isoline BR16 and transgenic P58 were subjected to 5% GH from 15% GH for 20 days.

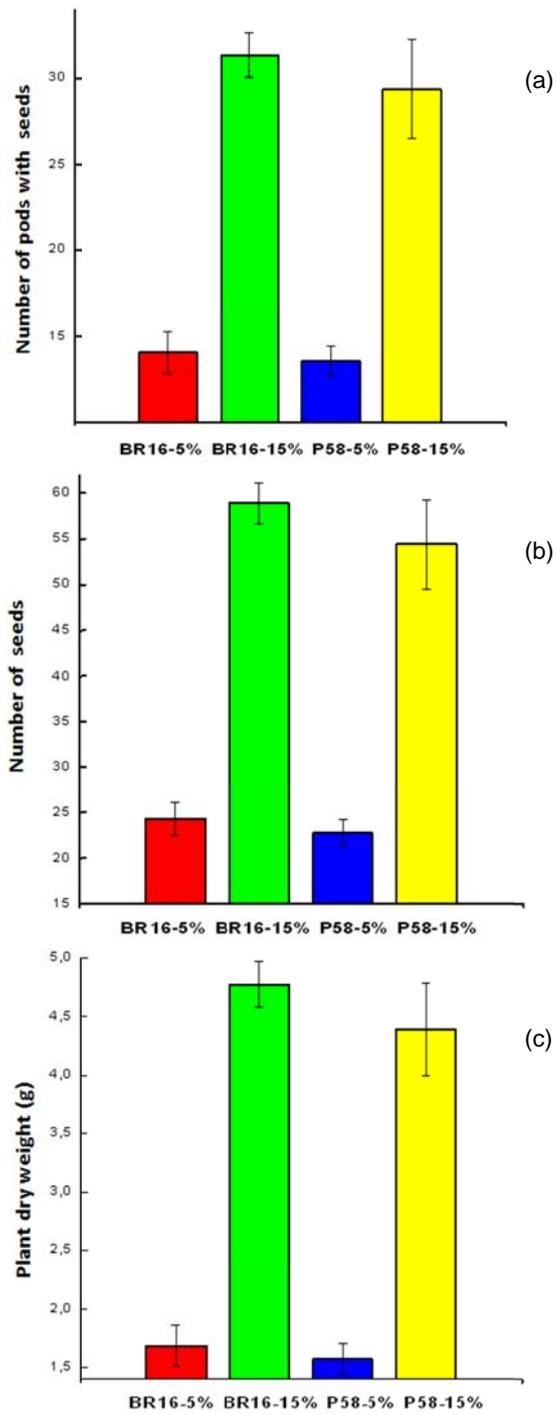


Figure 8 - Agronomical parameters in P58 line under water stress. Graphics showing in (a) number pods with seed, in (b) number of seeds and (c) plant dry weight. When the standard error bars of the means do not coincide, there is significant difference between means (Tukey test, $p \leq 0.05$).

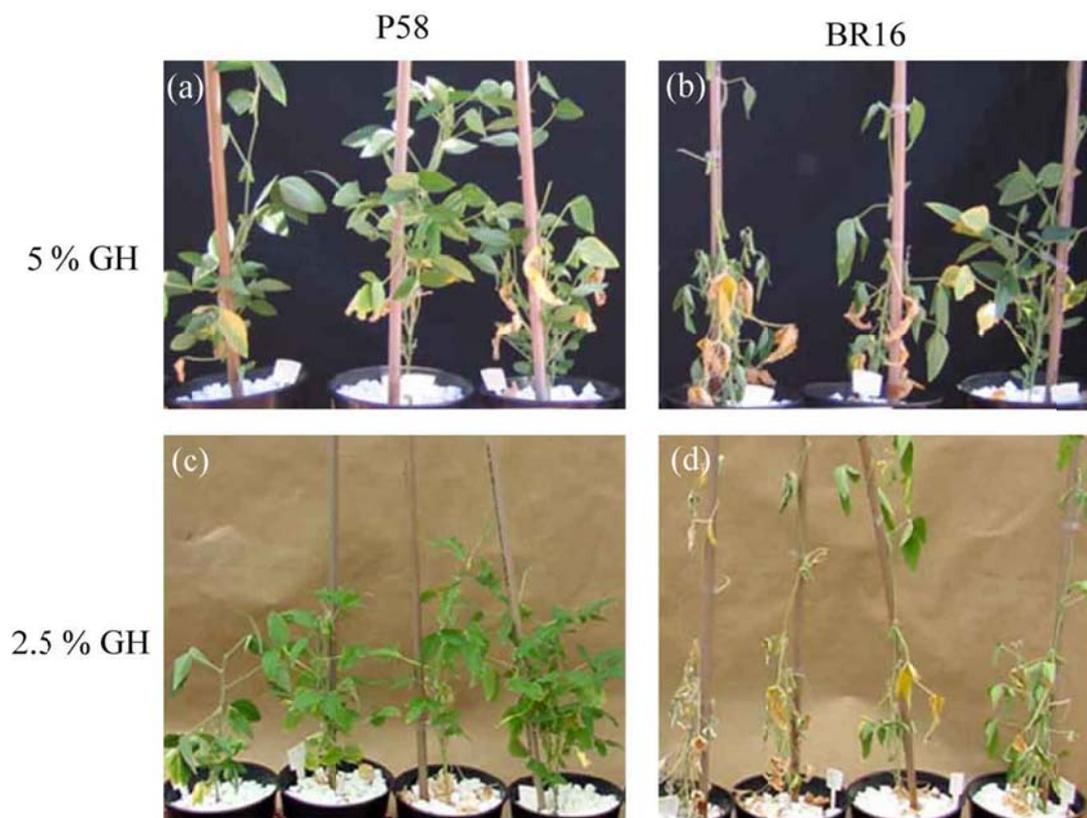


Figure 9 - P58 line containing the *RD29A: AtDREB1A* construct and the non-transgenic isoline BR16. (a) Transgenic P58-positive under moderate water stress [5% gravimetric Humidity – (GH)], (b) non-transgenic isoline BR16 at a moderate water stress (5% GH), (c) transgenic P58-positive under severe water stress (2.5% GH) and (d) non-transgenic isoline BR16 under severe stress (2.5% GH). All plants were kept at soil-optimal water-content conditions (15% GH) for approximately 31 days after emerging until entering the reproductive stage. After this period, irrigation was withheld from the stress-treatment pots until the GH values reached 5% (moderate stress). After 29 days at 5% GH, irrigation was again withheld to 2.5% GH (severe stress) until harvesting.

Discussion

The GUS histochemical results confirmed induction of the *RD29A* promoter from *Arabidopsis thaliana* in *RD29A:GUS* soybean tissues. Although this approach was not intended to quantify GUS expression, it was possible to observe differences in the intensity of *GUS* expression with increasing dehydration time. Differences observed among the events probably resulted from differences in the location of transgene insertion in the soybean genome. Also, sampling conditions, such as the size and thickness of tissue and leaf age, may affect promoter activity [35, 36, 37, 38]. Nevertheless the presence of *DREB1A* transcripts detected by RT-qPCR also confirmed that the *Arabidopsis thaliana RD29A* stress-inducible promoter is activated in transgenic soybean plants during water deficits; however, the amount of transcript present was not quantified by fluorimetric assays in our work. Another important characteristic observed by other authors [14] is that the *RD29A* promoter can be induced in all plant organs, including roots, where it acts as a component of the stress perception and signaling process during water deficits. The *Arabidopsis RD29A* promoter is drought-inducible; however, genetically modified tobacco plants with *AtRD29A:DREB1A* elements show induction from this promoter even under control conditions, which agrees with our results (Figure 4) in which a basal level of *AtDREB1A* expression was detected in soybean [20].

Differences in expression patterns observed between P58 and P1333 plants might be related to the number of transgene copies integrated into the plant genome or the physical localization of the insert. The presence of a high number of transgene copies in the plant genome can provoke a reduction in expression level and even cause silencing [44, 45]. Low expression or inactivation of transgenes can also occur in plants

carrying a single copy of the transgene [46]. Differences observed in the expression levels of genes in P58 and P1333 plants under control and stress conditions might be related to position effects. Transgenes integrated into actively transcribed regions are often more stably expressed, while those integrated into transcriptionally inactive regions or in highly condensed chromatin regions show lower or inactive expression [47, 48].

Constitutive gene expression of *DREB1A* directed by the CaMV 35S promoter produces negative effects on plant growth and development, as shown in *Arabidopsis* [20], tomato [39] and tobacco [8]. However, the expression of *DREB1A*, from a stress-inducible promoter such as *RD29A* minimizes these effects and also increases drought tolerance [8, 20]. Therefore, we used the *Arabidopsis RD29A* promoter to control the *DREB1A* gene in soybean. Our data show that GM soybean had higher expression of the *AtDREB1A* transgene under water deficit conditions, which improved physiological parameters (Figure 5) without leading to a growth deficiency (Figure 3). *DREB1A* transcription factors control the expression of wide number of genes in drought defense responses [49,50] and our results suggest that the use of *RD29A:DREB1A* in soybean might promote the same tolerance results that have been observed in other transgenic crops [4, 6, 7, 8, 21, 24].

The *PIP1* gene encodes an aquaporin, a water-channel protein that controls water movement between cells. A decrease in available water causes reductions in stomatal conductance, net photosynthesis, water-use efficiency and transpiration. Aroca et al. [40] showed that higher expression of the gene that encodes PIP2 in leaves of *Phaseolus vulgaris* exposed to drought is correlated with a reduction in transpiration rate and an improvement of water-use efficiency (WUE). Our results show that *GmPip1*

was highly expressed in P58 plants after 20 days of water stress, suggesting that this gene is directly activated by the DREB1 transcription factors and might be involved in responses to drought in soybean.

Galactinol synthase (Gols) is a key enzyme in the biosynthesis of the raffinose family of oligosaccharides (RFOs). The protective function of RFOs against dehydration has been demonstrated in *Arabidopsis* transgenic plants with constitutive expression of *AtGols2*. These plants have higher galactinol and raffinose contents in leaves, promoting increased tolerance of drought [41, 42, 43]. The differential gene expression of *GmGols* in transgenic P58 plants after 20 days of stress corroborates data in the literature; Taji et al. [43] found in *Arabidopsis* transformed with a *35S:DREB1A* construct a significant accumulation of RNA from *AtGols3* in non-stressed plants and strong gene expression under cold-stress conditions. They identified two DRE sequences in the promoter region of *AtGols3* [43], indicating that this gene belongs to the *DREB* gene-activation cascade. Our results confirm that the *AtDREB1A* transcription factor, when introduced and over-expressed in soybean, activates endogenous soybean genes such as *GmGols* (Figure 6). Non-stressed BR16 plants also displayed elevated levels of *GmGols* gene expression during water deficit; however, this expression was delayed and smaller in scale when compared to the expression in GM soybean (Figura 6).

Results from the greenhouse experiments regarding the physiological, agronomical, morphological and anatomical characterizations of the various soybean plants in our study demonstrated that the over-expression of the *AtDREB1A* gene altered physiological and molecular responses in P58 and 1333 GM lines submitted to water deficit, which subsequently increased these plants' tolerance to drought. In addition to

the higher net photosynthesis and photosynthetic efficiency observed on many of the sampling dates after stress initiation, reductions in wilting and senescence velocity daily and at the end of the cycle, respectively, were observed. Field experiments are necessary to evaluate whether the gains observed in the efficiency of the physiological parameters tested will result in lower yield losses when compared to non-GM plants under real drought conditions.

Conclusion

Using a combination of the *A. thaliana* *RD29A* stress-induced promoter and the *AtDREB1A* transcription factor introduced into soybean, we obtained increased expression of two genes involved in drought tolerance and superior physiological adaptations in genetically modified plants. Despite the fact that significant differences in agronomical traits were not evident under greenhouse growth-limiting conditions, it is possible that differences could arise under field conditions. In the field, the GM plants will be exposed to better light and soil characteristics for shoot and root development, and the improvement in drought tolerance, via various physiological characteristics, facilitated by the over-expression of *AtDREB1A* might impede losses of yield during drought events.

Methods

Plant material and bioballistic transformation protocol

The drought-sensitive Brazilian soybean cultivar BR16 [27] was transformed with *RD29A:AtDREB1A* or *RD29A:GUS* linear constructs according to previous studies [28, 29]. To confirm positive events for *RD29A: AtDREB1A* and *RD29A:GUS* construct insertion, different sets of primers were used (Table 1, Figure 1) in PCRs. Reactions were carried out in a Gene Amp PCR System (Applied Biosystems, USA).

Histochemical GUS Assay

Histochemical GUS assays were performed in the *RD29A:GUS*-transformed P1234, P1251 and P1263A lines while in the reproductive stage according to a previous study [30]. As a control, a *35S:GUS*-transformed soybean plant was used. One leaflet from each plant was cut into eight parts, corresponding to treatment times of 0, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 min of cellular dehydration at 37°C and 50% relative humidity.

Southern-blot analysis

To check the number of *RD29A:AtDREB1A* insertions, Southern blots from P58 and P1333 T₂-generation lines were performed. Genomic DNA was isolated following the methods described by [32], and the DNA (10 µg) was then digested with *HindIII* restriction enzyme (Invitrogen), separated in a 1.0 % agarose gel and transferred to a nylon membrane (Bio Agency). For probing, the *DREB1A* gene coding region (100 ng) was labeled with [³²P] dCTP with a GE Healthcare pd(N)₆ random hexamer DNA (Life Sciences). Southern blotting and hybridization were carried out according to [33]. Non-

transformed isolate BR16 was used as negative control, and *RD29A:AtDREB1A* was used as positive control.

Greenhouse drought conditions experiments in P58 and P1333 plants in T₂-generation

Three identical experiments were performed under greenhouse conditions using water deficit treatments to analyze photosynthesis, photosynthetic efficiency, net transpiration, stomatal conductance, anatomical structure and agronomical parameters in a complete randomized block design. Plants were divided into two groups according to their water supply: a control group at 15% of gravimetric humidity (GH) (near field capacity) during the whole experiment and a stressed group at 5% GH (moderate stress) and later at 2.5% of GH (severe stress) [34].

Each group comprising 12 plants of each genotype [P58 and P1333 plants from the T₂-generation and control plants (non-transgenic BR16)] was grown in 10-L pots with sand that were irrigated twice per week with a pH 6.6 balanced nutrient solution and kept at 15% gravimetric humidity (GH) (near field capacity) for approximately 31 days after emerging, until the reproductive stage. After this period, irrigation was withheld from the stressed-group pots until the GH values reached 5% (moderate stress), which occurred 60 days post-emergence. Pots were weighed twice per day, and water was added as needed to maintain the desired GH values. After 29 days at 5% GH, irrigation was again withheld to achieve 2.5% GH (severe stress) until harvesting at 110 days after germination.

Physiological evaluations were carried out at 12 time points, and the desired stress values 5% and 2.5% gravimetric humidity were reached at the 1st (6 days after stress initiation) and 7th (41 days after stress initiation) evaluation dates, respectively (Figure

5). Evaluations were conducted with *Photosynthesis System* (LICor, Inc., model LI-6400) portable photosynthesis equipment using the completely expanded median leaflet in the second leaf pair from the top under a light intensity of approximately $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Stomatal deviation was used to look for significant differences among the treatments.

RT-qPCR Assay in P58 and P1333 plants in T₂ generation

To assess *AtDREB1A* expression in soybean, three samples from each transgenic P58 and P1333 T₂-generation line and isoline BR16 (non-transformed control) were collected 34 days after the beginning of the water deficit treatments (15% and 5% GH). All samples were placed in liquid nitrogen immediately after sampling and stored at -80°C .

Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. For complementary DNA (cDNA) synthesis, MMLV reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies Cat. No. # 28025-013) was used, following the method described by [31]. As an endogenous control for normalization, gene *GmrRNA18S* (Accession No.: X02623.1) was used.

The PCRs were carried out on the ABI 7300 sequence detection system (Applied Biosystems) with the Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG Kit (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's instructions.

RT-qPCR assay and morphological, anatomical and agronomic characterization in P58 T₂ generation

To analyze the effects of *RD29A:AtDREB1A* insertion on P58 transgenic T₂-generation plants, morphological, anatomical and agronomic characterizations, as well as RT-qPCR, were carried out in the greenhouse experiment.

The expression levels of two genes known to be involved in plants defense against drought were quantified: *GmGolS* (Genbank accession No. 32345693), which encodes the galactinol synthase enzyme (GolS, UDP-galactose:myo-inositol galactosyltransferase, EC 2.4.1.123) that has a key function in the biosynthesis of raffinose, an important substance to protects seeds from desiccation, and *GmPip1* (Genbank accession No. U27347), which encodes a plasma-membrane intrinsic protein (PIP) and is part of an aquaporin. Three samples from transgenic line P58 and isoline BR16 (non transformed control) were collected after 20 days (5% GH, moderate stress), 34 days (5% GH, moderate stress) and 41 days (2.5% GH, severe stress) after the beginning of the water deficit treatments. The design of real-time qPCR primers and the use of other parameters was as described above for *AtDREB1A*.

Anatomical studies of leaflets sampled at 20 (5% GH) and 34 days (2.5% GH) after stress initiation were conducted using photonic microscopy (Leica Microscopy Systems DM LB CH-9435 Heerbrugg DC 200) and electron microscopy (JEOL JSM 5510).

Agronomic parameters, such as plant life cycle, plant height, plant dry height, number of seeds yielded per plant, number of pods with seeds, node number per plant, average internodes length, and fresh and dry weights of roots and leaves, were sampled at plant maturity. ANOVA and Tukey tests were performed using SAS software [51].

Authors' contributions

SRRM prepared the constructs for transformation. EB sequenced DNA constructs. MAB and AAPR transformed *RD29A:AtDREB1A* and *RD29A:GUS* into soybean and maintained the lines in vitro and in the greenhouse. MAB, NY, SRMM and AAPR contributed to the initial characterization of the transgenic lines. FCM conducted the real-time assays. RVA contributed to the molecular analysis. AMP, RSM and AAPR performed greenhouse drought experiments in T₂-generation P58 and P1333 plants. JRBF and NN contributed to physiological analyses. MCNO performed the statistical analyses. ALN, KYS and KN conceived and coordinated the study. MAB and ALN wrote the manuscript. RF and MFGS edited the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Dr. Norihito Kanamori of the Japan International Research Center for Agriculture Science for reviewing the manuscript. Norihito Kanamori was supported by a JSPS fellowship.

References

1. **Embrapa - Soybean National Research Center**
[http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=142&cod_pai=76]
2. **CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento**
[<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=101>]
3. Flanders A, McKissick J, Tommie S: **Georgia Economic Losses Due to 2007 Drought**. Center for Agribusiness and Economic Development College of Agricultural and Environmental Sciences 2007, Center Report: CR-07-10.
4. Bhatnagar-Mathur P, Devi MJ, Reddy DS, Lavanya M, Vadez V, Serraj R, Yamaguchi-Shinozaki K, Sharma KK: **Stress-inducible expression of AtDREB1A in transgenic peanut (Arachis hypogaea L.) increases transpiration efficiency under water-limited conditions**. *Plant Cell Reports* 2007, **26**:2071-2082.
5. Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu JK: **Understanding and improving salt tolerance in plants**. *Crop Sci* 2005, **45**:437-448.
6. Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet ED, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K: **Os-DREB genes in rice, Oryza sativa L., encoded transcription activators that function in drought, high-salt and cold-responsive gene expression**. *Plant Journal* 2003, **33**:751-763.
7. Ito Y, Katsura K, Maruyama K, Taji T, Kobayashi M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K: **Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice**. *Plant Cell Physiol* 2006, **47**(1): 141–153.

8. 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 Physiol* 2004, **45**(3):346-350.
9. Zhou G, Chang R, Qiu L: **Overexpression of soybean ubiquitin-conjugating enzyme gene GmUBC2 confers enhanced drought and salt tolerance through modulating abiotic stress-responsive gene expression in Arabidopsis.** *Plant Mol Biol* 2010, **72**:357-367.
10. Mochida K, Yoshida T, Sakurai T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LP: **In silico analysis of transcription factor repertoire and prediction of stress responsive transcription factors in soybean.** *DNA Research* 2009, **16**:353-369.
11. Bartels D, Sunkar R: **Drought and salt tolerance in plants.** *Crit. Rev. Plant Sci* 2005, **21**:1-36.
12. Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K: **Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses.** *Annu Rev Plant Biol* 2006, **57**:781-803.
13. Nordin, K., Heino, P. and Palva, E.T: **Separate signal pathways regulate the expression of a low-temperature-induced gene in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.** *Plant Mol Biol* 1991, **16**:1061-1071.
14. Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki, K: **Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of Arabidopsis thaliana and analysis of its promoter in transgenic plants.** *Mol Genet Genomic* 1993, **236**:331-340.

15. Iwasaki T, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K: **The dehydration-inducible rd17 (cor47) gene and its promoter region in Arabidopsis thaliana.** *Plant Physiol* 1997, **115**: 1287-1293.
16. Yamaguchi-Shinozaki K, Kasuga M, Liu Q, Nakashima K, Sakuma Y, Abe H, Nakashima K, Sakuma Y, Abe H, Shinwari ZK, Seki M, Shinozaki K: **Biological mechanisms of drought stress response.** *JIRCAS Working Report* 2002, p.1-8.
17. Liu, QM, Kasuga Y, Sakuma H, Abe S, Miura K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki, K: **Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis.** *Plant Cell* 1998, **10**:1391-1406.
18. Stockinger EJ, Gilmour SJ, Tomashow MF: **Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting and water deficit.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**(3):1035-1040.
19. Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF: **Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance.** *Science* 1998, **280**:104–106.
20. 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 Biotech* 1999, **17**: 287-291.
21. Pellegrineschi A, Reynolds M, Pacheco M, Brito RM, Almeraya R, Yamaguchi-Shinozaki K, Hoisington, D: **Stress-induced expression in wheat of the**

- Arabidopsis thaliana DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions.** *Genome* 2004, **47**:493–500.
22. Celebi-Toprak F, Behnam B, Serrano G, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Naka H, Watanabe JÁ, Yamanaka S, Watanabe KN: **Tolerance to Salt Stress of the Transgenic Tetrasomic Tetraploid Potato, *Solanum tuberosum* cv. Desiree Appears to be Induced by the *DREB1A* Gene and *rd29A* Promoter of *Arabidopsis thaliana*.** *Breeding Science* 2005, **55**: 311-319.
23. Behnam B, Kikuchi A, Celebi-Toprak F, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Watanabe KN: **Arabidopsis *rd29A*:DREB1A enhances freezing tolerance in transgenic potato.** *Plant Cell Rep* 2007, **26**:1275–1282.
24. Jiang Y, Qin F, Li Y, Fang X, Bai C: **Measuring specific interaction of transcription factor ZmDREB1A with its DNA responsive element at the molecular level.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**(12): e101.
25. Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K: **Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression.** *Plant Cell* 2006, **18**: 1292-1309.
26. Nakashima K, Tran LS, Van Nguyen D, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K: **Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice.** *Plant J* 2007, **51**:617-630.
27. Oya T, Nepomuceno AL, Neumaier N, Farias JRB, Tobita S, Ito O: **Drought tolerance characteristics of Brazilian soybean cultivars in the field.** *Plant Prod Sci* 2004, **7**(2):129-137.

28. Aragao FJL, Sarokin L, Vianna GR, Rech EL: **Selection of transgenic meristematic cells utilizing an herbicidal molecule results in recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency.** *Theor Appl Genet* 2000, **101**:1-6.
29. Rech EL, Vianna GR, Aragão FJL: **High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants.** *Nature Protocols* 2008, **3**(3):1-10.
30. Lacorte C, Romano, E: **Transferência de vetores para *Agrobacterium*.** In *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Edited by Brasileiro AC & Carneiro VTC. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; 1998:93-107.
31. Panchuk II, Volkov RA, Schoffl F: **Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*.** *Plant Physiol* 2002, **129**: 838-853.
32. Doyle, JJ, Doyle, JL: **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.** *Phytochem Bull* 1987, **19**:11-15.
33. Sambrook, J, Russel DW: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
34. Casagrande EC, Farias JRB, Neumaier N, Pedroso J, Martins PK, Breton MC, Nepomuceno AL: **Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja.** *Rev. Bras. Fisiol. Veg* 2001, **13**:168-184.
35. Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ, Salazar MP, Houghton JM, Thomashow M: **Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2**

- transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression.** *Plant J* 1998, **16**(4): 433-442.
36. Mlynarova L, Loonen A, Heldens J, Jansen RC, Keizer P, Stiekema WJ, Nap JP: **Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix-associated region.** *Plant Cell* 1994, **6**:417-426.
37. Van Leeuwen W, Ruttink T, Borst-Vremsen AWM, Van der Plas Linus HW, Van der Krol AR: **Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants.** *J Exp Bot* 2001, **52**(358): 949-959.
38. Van Leeuwen W, Mlynárová L, Nap JP, van der Plas LH, van der Krol AR: **The effect of MAR elements on variation in spatial and temporal regulation of transgene expression.** *Plant Mol Biol* 2001, **47**(4): 543-54.
39. Hsieh TH, Lee JT, Charng YY, Chan MT: **Tomato plants ectopically Expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress.** *Plant Physiol* 2002, **130**:618-626.
40. Aroca R, Ferrante A, Vernieri P, Chrispeels MJ: **Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in Phaseolus vulgaris plants.** *Ann. Bot* 2006, **98**:1301-1310.
41. Panikulangara TJ, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, Stransky H, Schoffl F: **Galactinol synthase1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in Arabidopsis.** *Plant Physiol* 2004, **136**:3148-3158.

42. Pattanagul W, Madore, MA: **Water deficit effects on raffinose family oligosaccharide metabolism in Coleus.** *Plant Physiol.* 1999, **121**:987-993.
43. Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki, K: **Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in Arabidopsis thaliana.** *Plant J* 2002, **29**(4): 417-26.
44. Pawlowski WP, Somers DA: **Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**: 12106-12110.
45. Barsi Z: **Trangene Inheritance in Transgenic Wheat.** *Jurnal Matematika dan Sains* 2005, **10**(N°1): 1-9.
46. Yin Z, Plader W, Malepszy S: **Transgene Inheritance in Plants.** *J Appl Genet* 2004, **45**(2): 127-144.
47. Pedersen C, Zimny J, Becker D, Jahne A, Lorz H: **Localization of introduced genes on the chromosomes of transgenic barley, wheat and triticale by fluorescence in situ hybridization.** *Theor Appl Genet* 1997, **94**: 749.
48. Makarevitch I, Svitashv SK, DA Somers: **Complete sequence analysis of transgene loci from plants transformed via microprojectile bombardment.** *Plant Molecular Biology* 2003, **52**: 421-432.
49. Murayama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K: **Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabdopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems.** *The Plant Journal* 2004, **38**: 982-993. 2004.

50. Oono Y, Seki M, Nanjo T, Narusaka M, Fujita M, Satoh R, Satou M, Sakurai T, Ishida J, Akiyama K, Lida K, Maruyama K, Satoh S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K: **Monitoring expression profiles of Arabidopsis gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA Microarray.** *The Plant Journal* 2003, 34: 868-887.

Capítulo 3

Análise proteômica de genótipos de soja GM (geneticamente modificada) e não GM submetida a déficit hídrico

RESUMO

A seca é um dos principais tipos de estresses abiótico que limitam o desenvolvimento das culturas, incluindo o cultivo da soja. Na busca por conhecimentos que possam contribuir para a solução ou a redução dos danos causados por esse problema, diferentes genes já foram isolados e uma melhor compreensão vem sendo obtida através do estudo dos mecanismos pelos quais as plantas respondem ao déficit hídrico. Plantas de soja transformadas com fatores de transcrição como DREB1A/CBF3 de *Arabidopsis thaliana* mostram aumento de tolerância à seca quando submetidas ao déficit hídrico, promovendo uma melhor aclimação ao estresse. Um dos alvos da biotecnologia e de programas de melhoramento tem sido o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (GM) tolerantes à seca visando à obtenção de genótipos superiores, entretanto, a sua aplicação em estudos de proteômica também pode levar a uma maior compreensão dos mecanismos de resposta, ou mesmo a identificação de novos genes em nível de proteínas. Neste contexto, foram comparados extratos protéicos de soja BR16 não transgênica e BR16(P58) transformada com a construção *RD29A:AtDREB1A* de *A. thaliana* em condições controle e sob déficit hídrico, utilizando 2-DE. A comparação dos géis bidimensionais possibilitou a identificação de proteínas comuns aos dois tratamentos assim como de “spots” diferenciais. Nos tratamentos de déficit hídrico, 25 “spots” foram identificados em BR16 não GM e 34 “spots” foram identificados em BR16(P58) GM. Embora tenham sido constatadas essas diferenças, análises de espectrometria de massa e pesquisas em bancos de dados serão necessárias para a validação desses dados e identificação das proteínas diferencialmente expressas em resposta ao déficit hídrico.

1. INTRODUÇÃO

A cada ano bilhões de dólares são perdidos devido aos estresses que acometem as culturas e previsões climáticas sobre eventos de secas cada vez mais constantes ameaçam ainda mais a produtividade das lavouras em todos os continentes (ROOT *et al.*, 2003; CIAIS *et al.*, 2005).

A cultura da soja, uma das principais *commodities* do mercado agrícola nacional e mundial (USDA, 2008; CONAB, 2010) tem sido severamente afetada nos últimos anos devido à falta de disponibilidade hídrica. No Brasil além de ser um fator limitante ao potencial produtivo da espécie, o déficit hídrico constitui-se na maior causa de diminuição dos rendimentos de grãos observados de um ano para o outro nas diferentes regiões do país (FARIAS, 2006; EMBRAPA, 2009).

Para os próximos anos um dos grandes desafios da ciência agrícola é compreender os mais variados mecanismos de respostas das plantas às alterações do meio ambiente na busca por genótipos superiores, mais tolerantes ou adaptados a diferentes condições adversas (TAYLOR & HEFLE, 2001; ISAAA 2009).

Atualmente, grandes avanços vêm sendo obtidos na compreensão dos efeitos provocados por déficit hídrico e como já estudado, uma das respostas iniciais ao estresse é a alteração da expressão gênica, a qual pode ser evidenciada tanto pela síntese de RNA mensageiro, quanto pela tradução de novas proteínas (BRAY, 2004; YAMAGUCHI-SHINOZAKI *et al.*, 2006).

Embora, nem sempre a abundância de RNAm é correlacionada com a quantidade de proteínas, devido a fatores como modificações pós-transcricionais

ou a degradação de proteínas já existentes, uma melhor abordagem sobre a atividade celular em resposta ao déficit hídrico pode ser alcançada aliando-se o conhecimento molecular disponível a estudos de proteômica (QUIRINO *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2010).

Fatores de transcrição são moléculas chaves no mecanismo de resposta a estresses como a seca, por serem capazes de ativar ou reprimir a transcrição de múltiplos genes alvo, desta forma, influenciando em muitos processos biológicos, tais como desenvolvimento, crescimento e estímulos ambientais (MOCHIDA *et al.*, 2009). Uma família de fatores de transcrição amplamente estudada em resposta a estresses como o déficit hídrico é a “Dehydration Responsive Binding protein” (DREB) de *A. thaliana* e, em sua via de ativação vários genes de proteção celular são conhecidos como: chaperonas, aquaporinas e osmoprotetores (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 1994; SAKUMA *et al.*, 2002).

Plantas transgênicas de batata transformadas com o fator de transcrição pertencente à família *AtDREB1A* dirigido por um promotor estresse induzido *RD29A* apresentam aumento de tolerância à seca e um maior nível de expressão gênica, levando a uma melhor aclimatação (PELLEGRINESCHI *et al.*, 2002). Assim, neste trabalho, o perfil protéico de folhas de soja BR16 geneticamente modificada com a construção *RD29A:AtDREB1A* de *A. thaliana*, nomeada BR16(P58) e BR16 não transgênica foram analisados sob condições de déficit hídrico com o objetivo de identificar proteínas cuja alteração de sua expressão esteja associada à maior tolerância, de forma a fornecer maiores evidências sobre mecanismos moleculares envolvidos na resposta ao déficit hídrico, ou mesmo a identificação de novas proteínas de soja ainda não descritas na literatura.

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1. Preparo dos Tecidos para as Análises em 2-DE

Para simular a condição de déficit hídrico, um experimento de hidroponia foi instalado em casa de vegetação (MARTINS *et al.*, 2008), utilizando sementes de soja da cultivar BR16 não transgênica, sensível à seca (OYA *et al.*, 2004) e sementes da linhagem transgênica tolerante à seca nomeada BR16(P58) (SALINET *et al.*, 2007).

Inicialmente, as sementes foram germinadas em câmara de crescimento (30°C e 60% de umidade) por aproximadamente quatro dias e as plântulas foram transferidas para casa de vegetação (temperatura 30°C ± 2°C e umidade relativa 60% ± 5%) e colocadas em suportes de polipropileno expandidos apoiados em caixas plásticas (36 L), contendo solução nutritiva (HEWITT, 1963) de modo que as raízes ficassem imersas na solução (Figura 1).



Figura 1. Montagem do experimento de hidroponia em casa de vegetação. A) Plântulas. B) Plantas em desenvolvimento. C) Raízes em contato com solução nutritiva. D) Experimento na fase de aplicação dos diferentes tempos de tratamentos de déficit hídrico.

Após três semanas de crescimento quando as plantas estavam no estágio de desenvolvimento vegetativo V_3 (plantas que possuem 18 a 23 cm de altura, quatro nós e folíolos desdobrados), o estresse hídrico foi aplicado retirando-se a solução nutritiva das caixas, e expondo as raízes a desidratação no escuro, conforme MARTINS *et al.* (2008) (Figura 2).



Figura 2. Coleta do material sob tratamento de déficit hídrico. A) Esgotamento da solução nutritiva. B) Planta de soja sob efeito de estresse hídrico. C) Coleta do material.

Cada tratamento (BR16-T0, BR16-T90, BR16(P58)-T0 e BR16(P58)-T90) foi composto de 50 plantas, as quais foram distribuídas em delineamento de blocos ao acaso, totalizando 200 plantas no experimento. Os tempos de tratamento de déficit hídrico consistiram de 0 minuto (controle sem estresse) e 90 minutos de estresse, tempos rigorosamente cronometrados. Foi coletado um trifólio de cada planta para cada tratamento imposto. A coleta do material foi realizada o mais rapidamente possível em nitrogênio líquido e posteriormente armazenando à -80 °C, até o momento da extração de proteínas para se evitar possíveis diferenças de expressão gênica decorrentes da manipulação mecânica dos tecidos foliares.

2.2. Extração de Proteínas de Folhas de Soja

A extração das proteínas de folhas de soja foi realizada de acordo com o protocolo descrito por SHEN (2002), com modificações (MESQUITA *et al.*, 2009; Figura 3). Cerca de 3,0 g do material foliar liofilizado, foi macerado em nitrogênio líquido e em seguida, juntamente com polivinilpolipirrolidona (PVPP) 2% p/v, adicionado a 20 mL de solução tampão de extração (Tris-HCl, pH 7,5, 40mM; sacarose 250mM; EDTA 10mM; Triton X-100 1%; PMSF 1mM; ditioneitol (DTT) 1mM; 2-mercaptoetanol 2% v/v). As amostras permaneceram sob agitação constante por 2h a 4 °C.

O material foi centrifugado duas vezes a 6.000 x g por 15min, a 4°C e as proteínas solúveis no sobrenadante foram precipitadas em solução de ácido tricloroacético TCA 10% (v/v) em acetona gelada e PMSF 1mM + EDTA 2mM,

permanecendo “overnight” à -20°C. A seguir, as amostras foram centrifugadas a (6.000 x g) por 15min à 4°C. O precipitado formado foi coletado e lavado com acetona gelada até clarificação, sendo a última lavagem realizada com etanol 80%. O precipitado final foi recolhido, secado e as proteínas extraídas foram então colocadas em tampão de solubilização para gel 2-DE (Uréia 7M; Tiuréia 2M; CHAPS 2% p/v), seguidos de sonicação, centrifugação e coleta do sobrenadante. A estimativa da concentração de proteínas foi realizada utilizando-se o reagente “2-D Quant Kit da GE Healthcare”. Após a quantificação, as proteínas foram armazenadas à -20°C até o momento do uso.

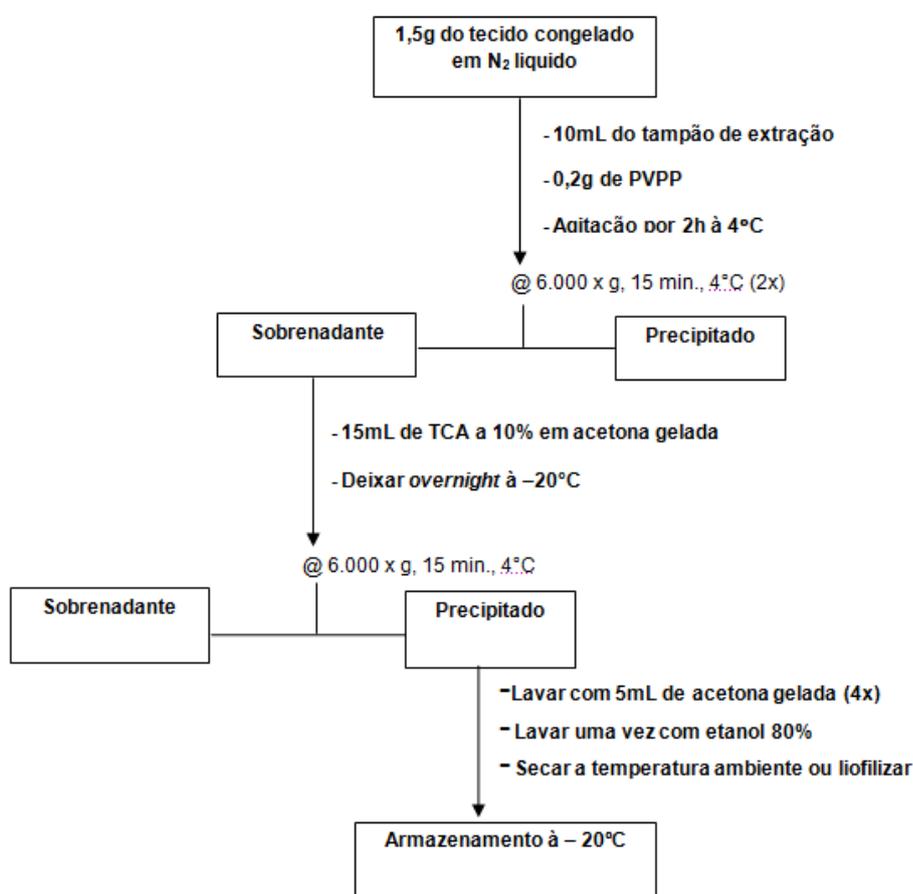


Figura 3. Modelo esquemático do método de extração utilizado. Modelo proposto por Shen (2002) e modificado por MESQUITA *et al.* (2010).

2.3. Gel de Poliacrilamida Desnaturante (Unidimensional) – SDS-PAGE

Para visualização das proteínas em SDS-PAGE e análise de pureza, quantidades iguais de proteínas (20 µg de cada tratamento) foram separadas em gel de poliacrilamida 12,5% de acordo com LAEMMLI (1970) e visualizadas por coloração com “Coomassie Brilliant Blue – R250”.

2.4. Eletroforese Bidimensional (2-DE)

A eletroforese bidimensional foi realizada utilizando-se tiras “Immobiline DryStrip” 18 cm, pH 3-10. Para cada tira, 800 µg de material foi diluído em 340 µL de tampão de reidratação (uréia 7M, tiouréia 2M, Triton X-100 0,4% v/v, CHAPS 2% p/v, ditioneitol (DTT) 1% p/v, buffer IPG 1% v/v com pH 3-10, Azul de Bromofenol 0,05%). Em seguida, a solução contendo as proteínas solúveis foi utilizada para a etapa de reidratação das tiras, por 14 horas, sob temperatura ambiente. A focalização isoeletrica (primeira dimensão) foi realizada no aparelho “Ettan IPGphor 3” (GE Healthcare Upsala, Suécia) utilizando-se o programa recomendado para tiras de 18 cm, pH 3-10 linear.

Após a focalização isoeletrica, as tiras foram equilibradas por 15 min em tampão de equilíbrio (Uréia 6M, Glicerol 30% v/v, SDS 2% p/v, azul de bromofenol 0,002%, Tris-HCl 50mM, pH 8,8) contendo 100mg/mL de DTT, seguidos de mais 15 min em tampão de equilíbrio contendo 25mg/mL de iodoacetamida. As tiras foram lavadas com tampão de corrida, e a segunda dimensão foi realizada em SDS-PAGE 12,5% no sistema “Ettan-DALTSix” (GE Healthcare Upsala, Suécia) com uma pré-corrída a 5W/gel por 30 min e 17W/gel por 4horas, a 15 °C. Os géis

foram corados com “Coomassie Brilliant Blue” R-250 digitalizados em scanner de alta precisão (ImageScanner III – GE) e analisados com o programa “Image Master 2D platinum” (v.7.0, GE).

2.5. Digestão de Proteínas em Gel com Tripsina

“Spots” de proteínas diferenciais foram excisados do gel corado, lavados com acetonitrila por 15 min para a desidratação do gel e secos a vácuo. Para a redução das pontes dissulfeto os fragmentos do gel foram incubados em solução de bicarbonato de amônio 0,1 M e DTT 0,01M, por 1 hora a 56°C. Em seguida, a solução de redução foi removida e as amostras foram alquiladas em solução de bicarbonato de amônio 0,1 M e iodacetamida 0,055 M por 45 min a 56°C. A solução de alquilação foi removida e os fragmentos do gel foram lavados duas vezes por 10 min em solução de bicarbonato de amônio 0,1 M. Para a descoloração do gel, as amostras foram lavadas com solução de acetonitrila 50% e bicarbonato de amônio 0,025 M até que todo o azul de “Coomassie” fosse removido. Após esse processo, a solução foi descartada e as amostras foram novamente desidratadas por incubação em acetonitrila por 10 minutos seguidas de secagem à vácuo. A digestão foi realizada pela adição de solução de bicarbonato de amônio 0,050M e tripsina (V511A PROMEGA) em uma concentração final de 10ng/μL. Em cada amostra foram adicionados 15μL da solução de digestão, sendo então, incubadas a 37°C, por 12 horas. Os fragmentos de gel foram retirados e a solução contendo os peptídeos digeridos foi utilizada para a obtenção dos espectros.

3. RESULTADOS

3.1. Eletroforese Unidimensional – SDS-PAGE

Plantas de soja transgênica BR16(P58) e não transgênica BR16 foram submetidas ao tratamento de déficit hídrico, a fim de se obter uma melhor compreensão das proteínas envolvidas em resposta a esse estresse abiótico. Primeiramente, a técnica de Eletroforese Unidimensional – SDS-PAGE foi utilizada, a fim de testar a eficiência do processo de extração utilizado e obter um perfil prévio de proteínas expressas em folhas de soja. Esta análise eletroforética em 1D exibiu perfis protéicos com pesos moleculares entre 15 e 200 kDa para todas as amostras testadas, GM e não GM, com qualidade suficiente para as análises de segunda dimensão (Figura 4).

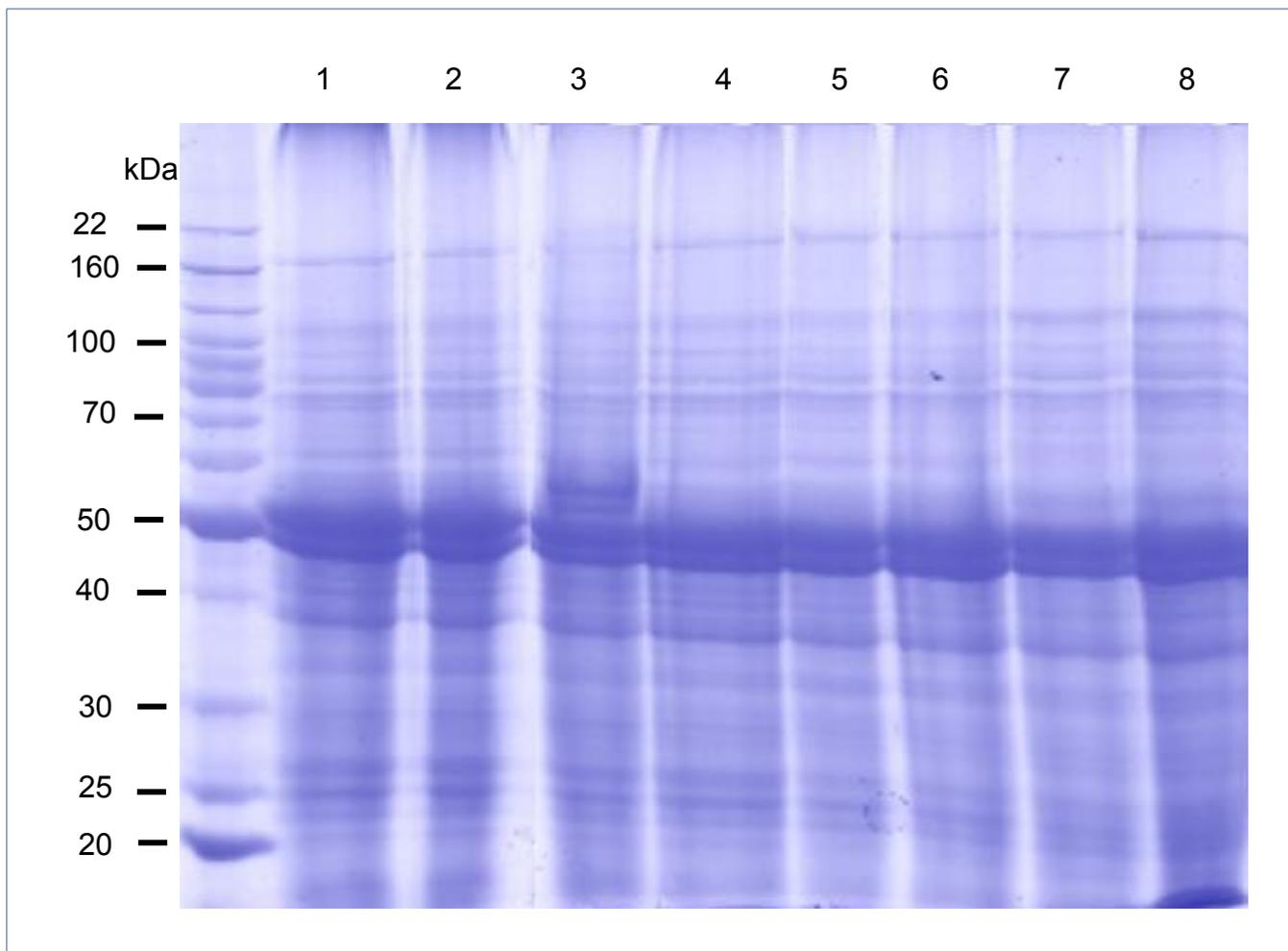


Figura 4. Eletroforese 1D de proteínas da cultivar de soja BR16 não transgênica e transgênica submetidas ao tratamento de déficit hídrico nos tempos de 0 e 90 min de estresse. 1-2) BR16-T0. 3-4) BR16-T90. 5-6) BR16(P58)-T0. 7-8) BR16(P58)-T90

3.2. Eletroforese Bidimensional 2-DE

Através da análise em 2-DE, foram investigadas as mudanças nos perfis de proteínas em resposta ao estresse hídrico. Para cada amostra, os géis foram realizados em triplicata, resultando em uma alta resolução no padrão de “spots” de proteínas, em um intervalo de pI entre 3 e 10 e massa molecular de 200 a 15 kDa, detectados pela coloração da “Comassie Brilliant Blue- R250”. Amostras das plantas controle (0 min de estresse) foram submetidas à eletroforese sob as

mesmas condições que as amostras das plantas sob déficit hídrico (90 min de estresse).

Foram realizadas análises quantitativas das amostras entre o controle e o tratado utilizando-se o “software Platinum Image Master 2D platinum 7.0” (General Eletrics). Estas análises mostraram grande reprodutibilidade dos resultados, havendo grandes semelhanças entre os géis de um mesmo tratamento (T0 ou T90) em linhagens diferentes (BR16 não GM e BR16(P58) GM). No primeiro grupo (BR16 não GM no tempo 0 comparado com o tempo 90 min), foram detectados em torno de 150 “spots” no perfil de proteínas nas triplicatas géis de 2-DE em ambos os tratamentos. Como resultado foram detectados 46 “spots” diferenciais entre as duas amostras BR16 ($p < 0,05$), sendo 16 “spots” presentes nos dois tratamentos, 5 “spots” presentes apenas em BR16-T0 e 25 “spots” em BR16-T90 (Figura 5 e 6). No segundo grupo, (BR16(P58) GM no tempo 0 comparado com o tempo 90 min) também foram detectados cerca de 150 “spots” de proteínas ($p < 0,05$), indicando 60 “spots” diferenciais, sendo 2 “spots” presentes nos dois tratamentos, 24 “spots” presentes apenas em BR16(P58)-T0 e 34 “spots” em BR16(P58)-T90 (Figura 7 e 8).

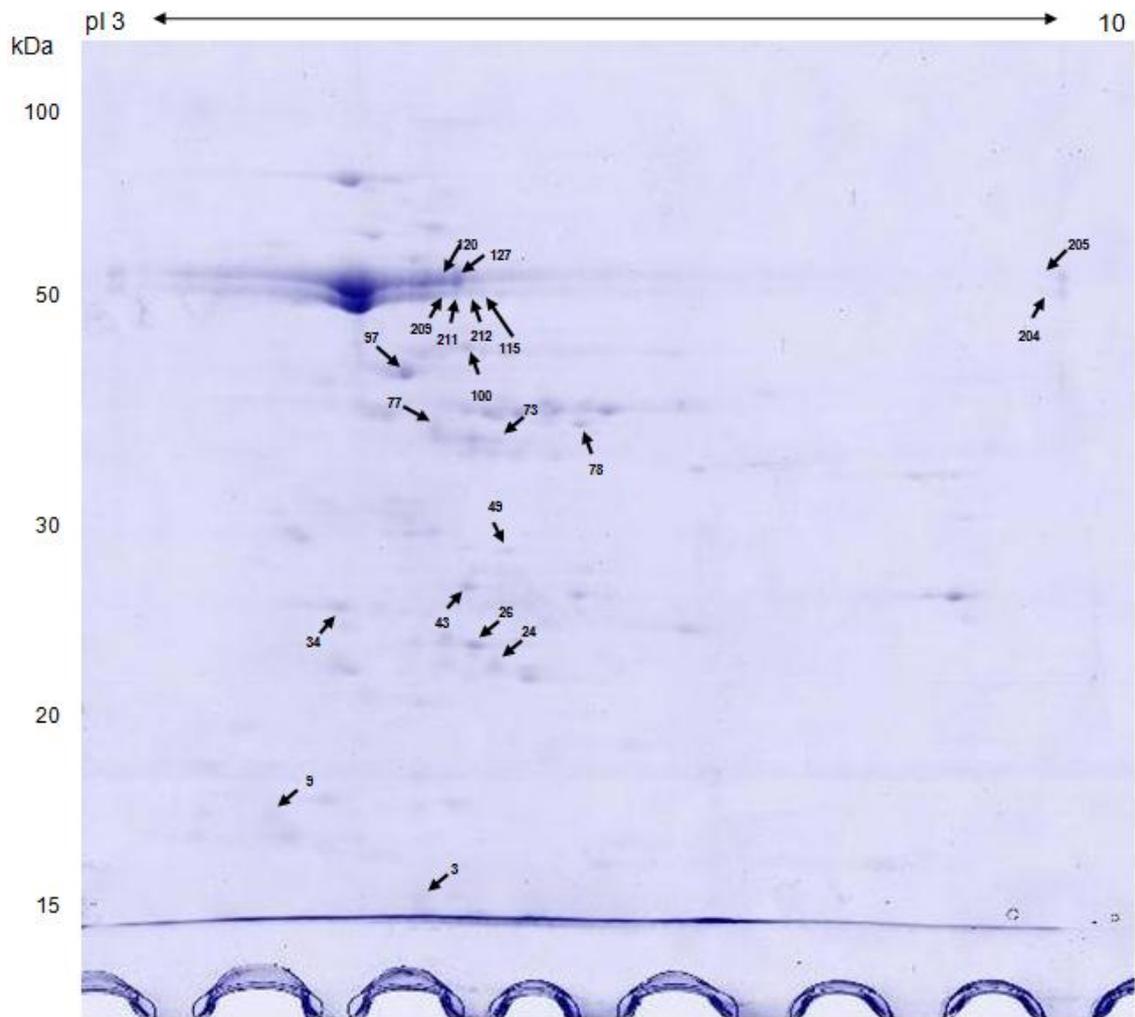


Figura 5. Análise 2-DE de folhas de soja BR16 não GM (T0). Perfil protéico de plantas controle (Tempo, 0 minutos de estresse). As flechas indicam os spots diferencias identificados pelo programa "Platinum Image Master 2D platinum 7.0" ($p < 0,05$).

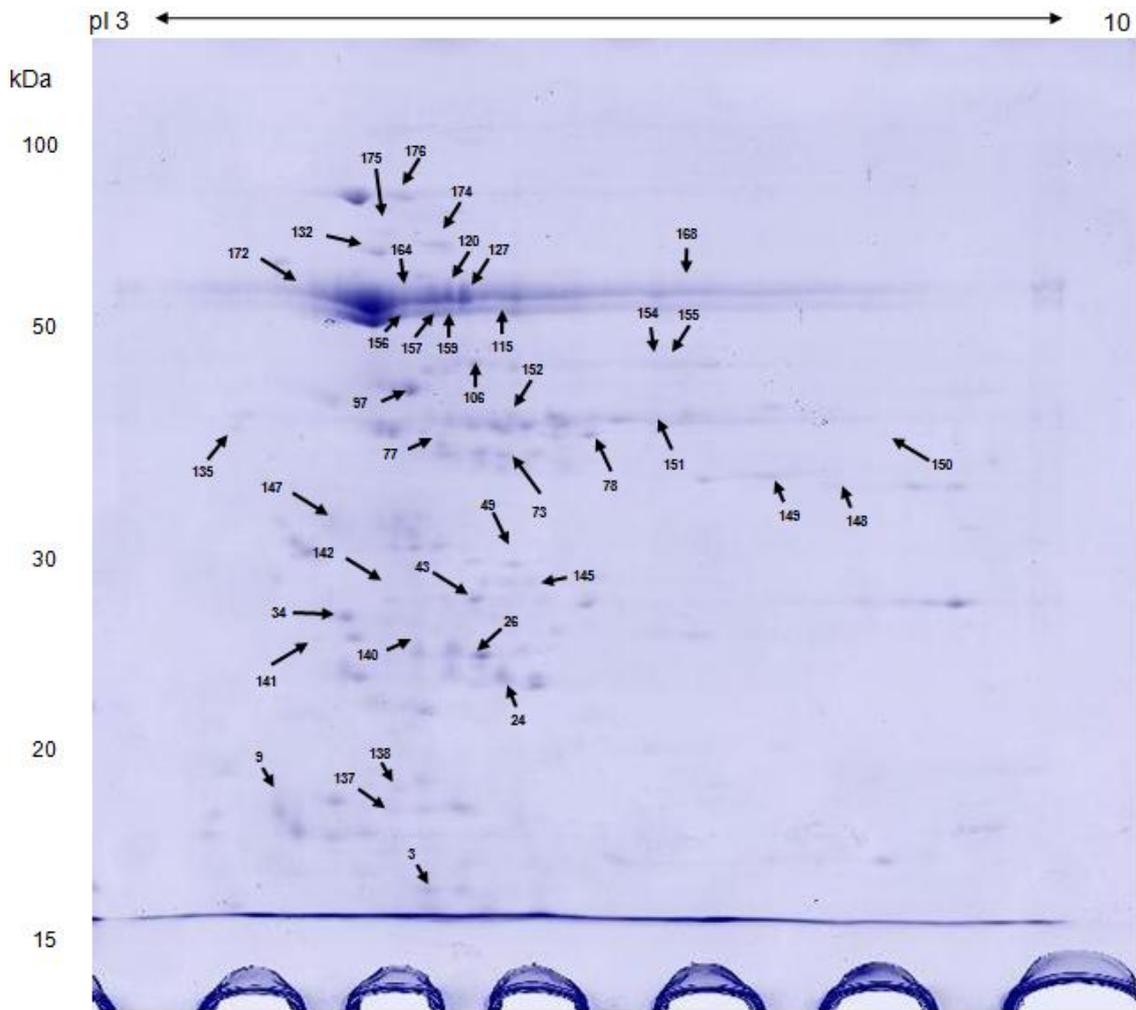


Figura 6. Análise 2-DE de folhas de soja BR16 não GM (T90). Perfil protéico de plantas de soja submetidas a 90 minutos de estresse hídrico. As flechas indicam os *spots* diferenças identificados pelo programa "Platinum Image Master 2D platinum 7.0" ($p < 0,05$).

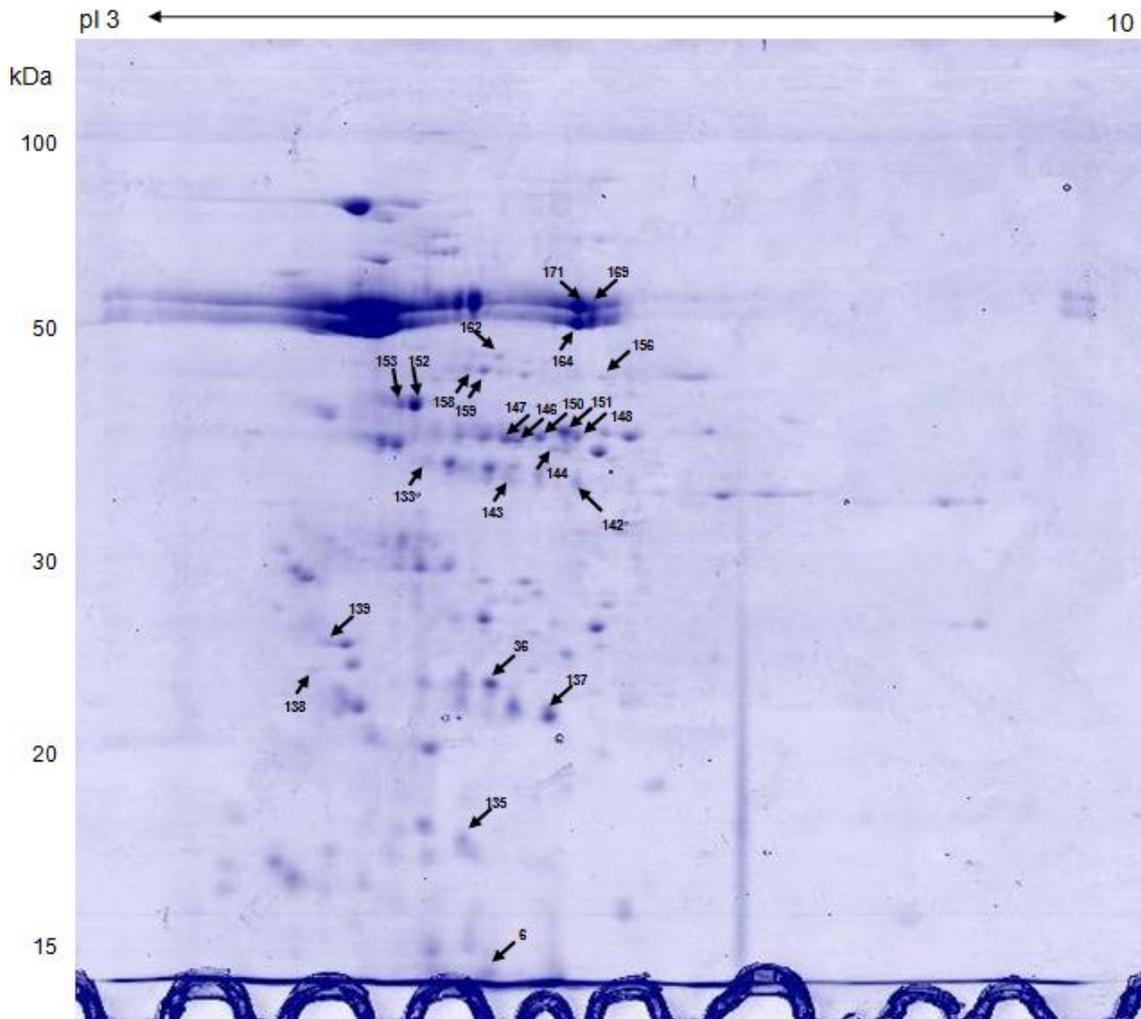


Figura 7. Análise 2-DE de folhas de soja BR16(P58) GM (T0). Perfil protéico de plantas controle (Tempo, 0 minutos de estresse). As flechas indicam os spots diferencias identificados pelo programa "Platinum Image Master 2D platium 7.0" ($p < 0,05$).

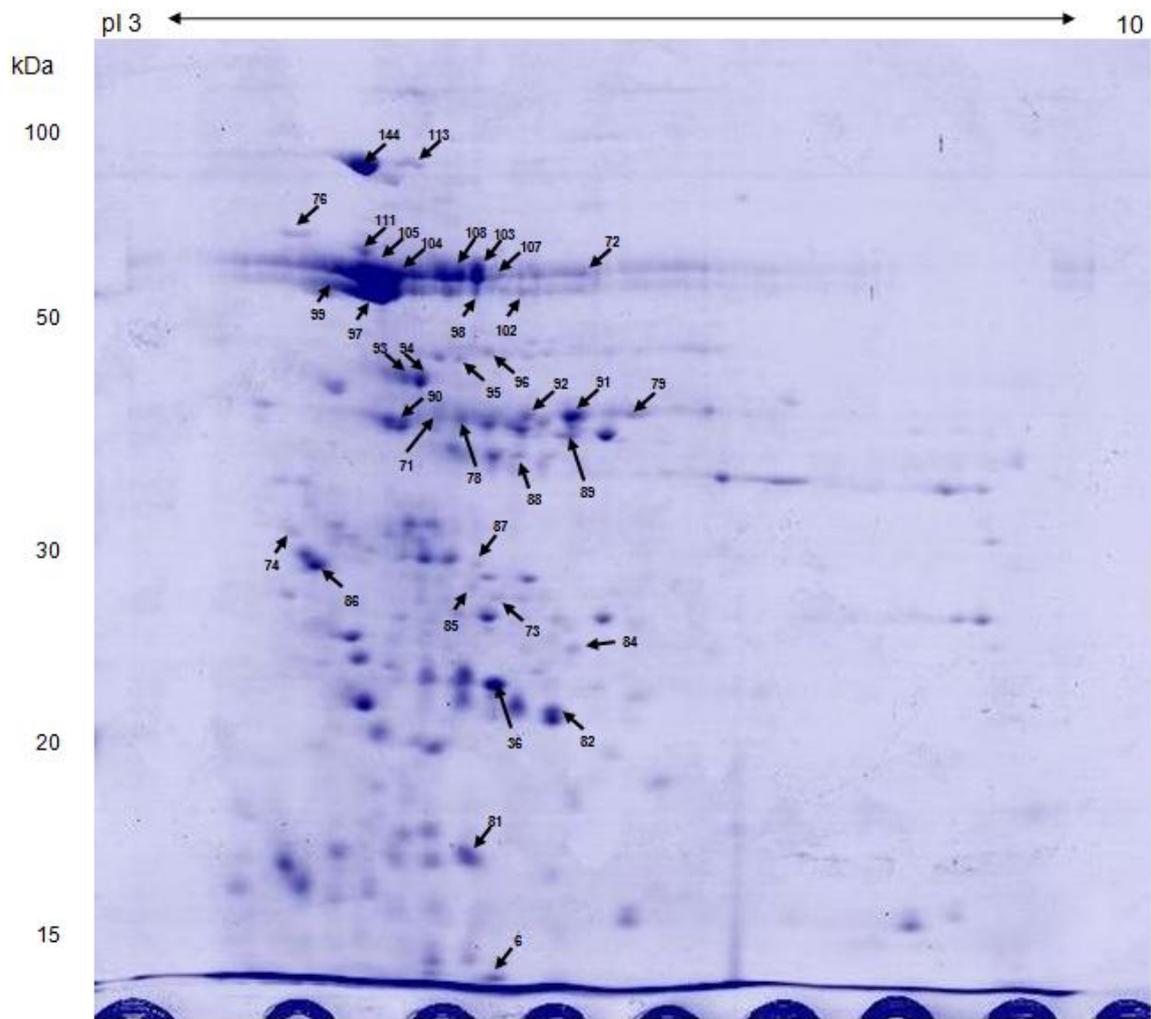


Figura 8. Análise 2-DE de folhas de soja BR16(P58) GM (T90). Perfil protéico de plantas de soja submetidas a 90 minutos de estresse hídrico. As flechas indicam os *spots* diferenças identificados pelo programa 'Platinum Image Master 2D platinum 7.0" ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

A tolerância das plantas em resposta à seca é uma característica complexa onde mecanismos de defesa trabalham isoladamente ou em conjunto de forma a evitar ou tolerar períodos de estresse (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2010). Mudanças fisiológicas, morfológicas e de desenvolvimento resultam de profundas alterações de base molecular/genética, as quais podem ser também evidenciadas pelo aumento ou diminuição na expressão e tradução de proteínas (CARUSO *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2008).

Sob situação de déficit hídrico, as folhas das cultivares..., BR16 não GM e BR16(P58) GM apresentaram “spots” diferenciais em comparação as amostras controles. Embora as diferenças ainda não tenham sido atribuídas às funções das potenciais proteínas identificadas em cada tratamento, o maior número e intensidade de “spots” identificados em folhas da linhagem BR16(P58) GM, fornece indícios de perfil protéico diferenciado em resposta à seca.

Estudos em linhagens de soja BR16(P58) transformadas com a construção *RD29A:AtDREB1A* e outras espécies como batata (CELEBI-TROPAK *et al.*, 2005) e trigo (PELLEGRINESCHI *et al.*, 2002) mostram que a super-expressão do fator de transcrição DREB1A mantém parâmetros fisiológicos e moleculares superiores em relação a plantas não GM durante o déficit hídrico. Assim, é possível que proteínas relacionadas ao metabolismo celular de defesa ao estresse sejam mais facilmente identificadas devido ao maior nível transcricional desencadeado por esse fator (SALINET, 2007; BEHNAM *et al.*, 2007).

Genes ativados pelo fator de transcrição *AtDREB1A* como os que codificam proteínas LEA (*rd29A*), enzimas detoxificantes (*erd13*) e canais de água (*rd28*),

promovem alteração no potencial osmótico celular aumentando a absorção de água, remoção de oxigênios reativos e conseqüente proteção de estruturas celulares (KASUGA *et al.*, 1999; OONO *et al.*, 2003). O acúmulo dos produtos da super-expressão desses genes pode favorecer a síntese de outras proteínas importantes para a manutenção do metabolismo da planta promovendo um ambiente celular com menores perturbações metabólicas e eventualmente, o balanço ótimo da conservação de água e absorção de carbono (LIU *et al.*, 2004; KATSUHARA & HANBA, 2008; DALAL *et al.*, 2009).

Em uma análise do perfil eletroforético bidimensional de proteínas de raízes de soja submetida à seca, IFTEKHAR *et al.* (2010) identificaram 45 “spots” de proteínas diferencialmente expressas entre os quais 28 foram identificadas por espectrometria de massa. A comparação da expressão diferencial dessas proteínas mostrou que em situação de déficit hídrico, os níveis de 5 proteínas tiveram aumento, 21 diminuíram e 2 foram detectados apenas em condição de seca. As proteínas identificadas foram relacionadas ao metabolismo de carboidratos e nitrogênio, modificações da parede celular, transdução de sinal, defesa e morte celular programada.

Da mesma forma, a análise do perfil protéico de folhas de *Hippophae rhamnoides* L. sob déficit hídrico conduziu a identificação de quatro proteínas consideradas novas descobertas em plantas; uma co-chaperona Hsc20 tipo-J que funciona na montagem de ferro-enxofre, um possível transportador ABC que se liga ao ATP e atua em membranas de transporte, uma proteína envolvida na fixação de nitrogênio NtrX e uma chaperona HslU. Entre as 55 proteínas identificadas como diferencialmente expressas, três desapareceram sob

condições de seca, sete tiveram aumento de expressão e apenas três foram detectadas durante o estresse hídrico (Xu *et al.*, 2009).

Diante os múltiplos fatores que influenciam no nível celular de proteínas, a caracterização de genótipos e das respostas ao estresse hídrico demonstra-se cada vez mais eficientes através de abordagens em proteômica. Outros resultados apresentados por estudos recentes mostram que a identificação de proteínas diferencialmente expressas ainda incluem aumento de proteínas envolvidas na glicólise (aldolase), sinalização (calmodulina), transportadores iônicos (ATPase), função antioxidante (ascorbato peroxidase), fotossíntese (rubisco), reserva de nutrientes (vicilina) e transportadores de elétrons (ferrodoxina), além de revelar a complexa interação entre as rotas metabólicas responsáveis pela restauração da homeostase celular (MAHMOUD *et al.*, 2009; QUIRINO *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2010; MESQUITA, 2010).

Do mesmo modo, a diminuição ou ausência de proteínas relacionadas à respostas de defesa ao estresse, foi identificada pela diminuição de enzimas do metabolismo fotossintético e de carboidratos, sugerindo a inibição do metabolismo energético para a manutenção do turgor celular como parte de uma estratégia de aclimação a seca (LIU *et al.*, 2004; CASTILLEJO *et al.*, 2008; GEBEYEHU *et al.*, 2010).

Assim, para a identificação e avaliação da expressão de proteínas de folhas da cultivar BR16 não GM e a linhagem BR16(P58) GM submetidas ao déficit hídrico, este trabalho terá continuidade através da identificação dos “spots” de potenciais proteínas que estejam ligadas ao estresse imposto, elucidando suas possíveis funções descritas previamente em banco de dados. O cruzamento das

informações transcriptoma-proteoma contribuirá de forma relevante na busca pelo melhor entendimento dos mecanismos de tolerância à seca em soja, gerando informações que poderão contribuir significativamente para o avanço da ciência agrícola, como o isolamento de genes, desenvolvimento de plantas transgênicas ou mesmo a identificação de marcadores moleculares para o uso em programas de melhoramento de plantas, visando à obtenção de variedades mais tolerantes ao estresse hídrico.

5. REFERENCIAS

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

BRAY, E. A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 55(407): 2331-2341, 2004.

CARUSO, A.; CHEFDOR, F.; CARPIN, S.; DEPIERREUX, C.; DELMOTTE, F. M.; KAHLEM, G.; MORABITO, D. Physiological characterization and identification of genes differentially expressed in response to drought induced by PEG 6000 in *Populus canadensis* leaves. *J Plant Physiol*, 165: 932–941, 2008.

CASTILLEJO, M. A. ; MALDONADO, A. M. ; OGUETA, S. ; JORRIN, J. V. Proteomic Analysis of Responses to Drought Sunflower (*Helianthus annuus*) Leaves by 2DE Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Proteomics Journal*. 13: 59-71, 2008.

CIAIS, P. H.; REICHSTEIN, M.; VIOVY, N.; GRANIER, A. Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature*, 437: 529-533, 2005.

CELEBI-TOPRAK, F.; BEHNAM, B.; SERRANO, G.; KASUGA, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NAKA, H.; WATANABE, J. A.; YAMANAKA, S.; WATANABE, K. N. Tolerance to Salt Stress of the Transgenic Tetrasomic Tetraploid Potato, *Solanum tuberosum* cv. Desiree Appears to be Induced by the *DREB1A* Gene and *rd29A* Promoter of *Arabidopsis thaliana*. *Breeding Science*, 55: 311-319, 2005.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo levantamento, julho 2010 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab, 2010.

DALAL, M.; TAYAL, D.; CHINNUSAMY, V.; BANSAL, K. C. Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 *LEA* from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance. *Journal of Biotechnology*, 139(2): 137-145, 2009.

EMBRAPA. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil – 2009 e 2010. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste, 262p. (Embrapa Soja, Sistemas de Produções, 13), 2009.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; TOBITA, S.; DE ALMEIDA, I. R. Restrições da disponibilidade hídrica à obtenção de elevados rendimentos de grãos de soja. Resumos do IV Congresso Brasileiro de Soja Londrina-PR 5 a 8 de junho. Embrapa-Soja, 2006.

GEBEYEHU, S.; WIESE, H.; SCHUBERT S. Effects of drought stress on seed sink strength and leaf protein patterns of common bean genotypes. *African Crop Science Journal*, 18(2): 75 – 88, 2010.

HEWITT, E. J. Mineral nutrition of plants in culture media. *Plant Physiology*. In: Stewart FC (ed) *Plant Physiology*, p. 97-134, 1963.

IFTEKHAR, A.; SHAMIMA, A. S.; KYUNG-HEE, K.; JAE, K. Y.; MYUNG, S. C.; BYUNG-HYUN, L. Proteome analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress. *Plant and Soil*, 333(1-2): 491-505, 2010.

ISAAA. Pocket K No. 1 Questions and Answers About Genetically Modified Crops: A Pocketful of Information, 2009.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259): 680-685, 1970.

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 America Inc.*, 278(8934) 287-291, 1999.

KATSUHARA, M.; HANBA, Y. T. Barley plasma membrane intrinsic proteins (PIP Aquaporins) as water and CO₂ transporters. *Pflügers Arch - Eur J Physiol*, 456: 687–691, 2008.

LIU, F.; JENSEN, C. R.; ANDERSEN, M. N. Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development its implication in altering pod set. *Field Crops Reserch*, 86(1): 1-13, 2004.

MARTINS, P. K.; JORDÃO, B. Q.; YAMANAKA, N.; FARIAS, J. R. B.; BENEVENTI, M.; BINNECK, E.; FUGANTI, R.; STOLF, R.; NEPOMUCENO, A. L. Differential gene expression and mitotic cell analysis of the drought tolerant soybean (*Glycine max* L. Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar MG/BR46(Conquista) under two water deficit induction systems. *Genetics and Molecular Biology*, 31: 512-521, 2008.

MAHMOUD, T.; KIYOSHI, Y.; MOHAMMAD-ZAMAN, N.; SETSUKO, K. Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in soybean roots. *Peptides*, 30(12): 2108-2117, 2009.

MESQUITA, R. Caracterização fisiológica e análise proteômica diferencial de genótipos de soja submetidos a déficit hídrico. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

MOCHIDA, K.; YOSHIDA, T.; SAKURAI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K.; TRAN LAM-SON, P. In silico Analysis of Transcription Factor Repertoire and Prediction of Stress Responsive Transcription Factors in Soybean. *DNA Research*, 16: 353–369, 2009.

OONO, Y.; SEKI, M.; NANJO, T.; NARUSAKA, M.; FUJITA, M.; SATOH, R.; SATOU, M.; SAKURAI, T.; ISHIDA, J.; AKIYAMA, K.; LIDA, K.; MARUYAMA, K.; SATOH, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Monitoring expression profiles of Arabidopsis gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA Microarray. *The Plant Journal*, 34: 868-887, 2003.

OYA, T.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; TOBITA, S.; ITO, O. Drought tolerance characteristics of brazilian soybean cultivars. *Plant Production Science*, 7: 129-137, 2004.

PELLEGRINESCHI, A.; RIBAUT, J. M.; TRETOWAN, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; HOISINTONG, D. Progress in the genetic engineering of wheat for water-limited conditions. *JIRCAS Working Report*, 55-60, 2002.

QUIRINO, B. F.; CANDIDO, E. S.; CAMPOS, P. F.; FRANCO, O. L.; KRÜGER, R. H. Proteomic approaches to study plant-pathogen interactions. *Phytochemistry*, 71(4): 351-362, 2010.

ROOT, T. L.; PRICE, J. T.; HALL, K. R.; SCHNEIDER, S. H.; ROSENZWEIG, C.; POUNDS, J. A. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, 421, 57-60, 2003.

SAKUMA, Y.; LIU, Q.; DUBOUZET, J.G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K.; AND YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem. Biophys.*, 290: 998-1009, 2002.

SALINET, L. H.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, R. F.; NEPOMUCENO, A. L. Avaliação Fisiológica de soja geneticamente modificada visando tolerância à seca. Resumo apresentado no XICBFV - Gramado –RS. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, vol. 19, 2007.

SHEN, S.; MATSUBAE, M.; TAKAO, T.; TANAKA, N.; KOMATSU, S. A proteomics analysis of leaf sheath from rice. *J Biochem*, 132: 613:620, 2002.

SHINOZAKI K; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(2): 221–227, 2007.

TAYLOR, S. L.; HEFLE, S. L. Current reviews of allergy and clinical immunology. *J Allergy Clin Immunol.*, 107(5): 765-771, 2001.

USDA. Global Agricultural Supply and Demand: Factors Contributing to the Recent Increase in Food Commodity Prices/ WRS-0801 Economic Research Service/USDA. United States Department of Agriculture. 2008. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov/Publications/WRS0801/WRS0801.pdf?fn=7411700381>

XU, X.; YANG, F.; XIAO, X.; ZHANG, S.; KORPELAINEN, H.; LI, C. Sex-specific responses of *Populus cathayana* to drought and elevated temperatures. *Plant Cell Environ.*, 31: 850–860, 2008.

XU, G.; LI, C.; YAO, Y. Proteomics Analysis of Drought Stress-Responsive Proteins in *Hippophae rhamnoides* L. *Plant Mol Biol Rep*, 27: 153–161, 2009.

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

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stress. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 781-803, 2006.

YANG, F.; WANG, Y.; MIAO, L-F. Comparative physiological and proteomic responses to drought stress in two poplar species originating from different altitudes. *Physiologia Plantarum*, 139: 388-400, 2010.

ZHOU, G-A; CHANG, R-Z; QIU, L-J. Overexpression of soybean ubiquitin-conjugating enzyme gene GmUBC2 confers enhanced drought and salt tolerance through modulating abiotic stress-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.*, 72:357–367, 2010.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o atual cenário agrícola globalizado acréscimos nos rendimentos e diminuição nos custos e riscos de insucesso da produção de culturas passaram a ser exigências básicas à competitividade. Ferramentas que auxiliem na obtenção de produtos competitivos e ambientalmente sustentáveis são fundamentais para superar esses desafios. Neste sentido, a biotecnologia mostra-se uma ferramenta essencial no desenvolvimento de variedades com maior resistência ou capacidade de tolerar estresses ambientais como a seca.

Um fator-chave em quase todos os aspectos da resistência vegetal ao déficit hídrico é a capacidade de continuar translocando assimilados, pois quando há uma baixa disponibilidade de fotossintatos e diminuição no fluxo de carboidratos de folhas para outros tecidos esses fatores tornam-se potenciais contribuintes para o abortamento de vagens.

As linhagens de soja GM com a construção *RD29A:AtDREB1A*, apresentaram um perfil fotossintético superior em relação a plantas não GM e embora diferenças nas características agronômicas como número de vagens ou o número de sementes não tenham sido aparentes em casa de vegetação. O maior nível de expressão do fator de transcrição DREB1A em plantas GM promoveu melhora dos parâmetros fisiológicos através da expressão de genes de sua via metabólica como *GmGoLS* e *GmPip1* envolvidos na biossíntese de oligossacarídeos e aquaporinas. A expressão desses genes induzidos por *AtDREB1A* tem mostrado reduzir a transpiração nas folhas, aumentar o transporte água, CO₂ e proteger a célula contra danos oxidativos, o que ocasiona um melhor

desempenho fisiológico e acúmulo de fotoassimilados. Avaliações a campo com linhagens GM estão sendo conduzidas e essas permitirão dimensionar o melhor desempenho fisiológico das plantas transgênicas sobre a produtividade. Diante o perfil fisiológico superior iniciado pela super expressão do fator de transcrição *AtDREB1A* espera-se que as plantas transgênicas apresentem um melhor desempenho nos períodos críticos de desenvolvimento (floração e enchimento de grãos) durante déficits hídricos expressivos.

Para que outros testes em campo continuem sendo conduzidos, os dados obtidos na avaliação preliminar da biossegurança alimentar da proteína *AtDREB1A* contribuirão significativamente para o processo de liberação planejada ao meio ambiente, assim como, para a autorização de testes biossegurança alimentar com sementes transgênicas.

A avaliação de segurança alimentar da proteína *AtDREB1A in silico* mostrou que a proteína *AtDREB1A* não possui características associadas a proteínas antinutricionais, tóxicas ou alergênicas e a ausência de atividade hemolítica em eritrócitos humanos também atestou seu modo de ação específico à ligação em promotores de plantas, isentando qualquer potencial de efeito citotóxico.

A determinação inicial do perfil alergênico e toxicológico da proteína *AtDREB1A* é independente da modificação genética e pode ser estendido como um elemento da avaliação de segurança alimentar para qualquer variedade de planta que contenha e expresse a mesma proteína. Entretanto, análises segurança alimentar exigidas para a liberação comercial de

OGMs devem ser conduzidas separadamente utilizando as plantas de soja GM com a construção *AtDREB1A*.

A comparação do transcritoma e proteoma de plantas em condições de seca proporciona uma melhor compreensão da relação entre a quantidade de mRNA e proteína e proporciona uma avaliação direta dos processos bioquímicos e regulação da transcrição e tradução. Abordagens de genética direta ou reversa que levem a identificação de novos genes envolvidos no déficit hídrico são de fundamental importância para desenvolvimento de novas tecnologias e detenção do conhecimento científico através da obtenção de patentes.

Assim, para uma melhor investigação das vias regulatórias e dos mecanismos de tolerância a seca, plantas de soja GM com a construção *AtDREB1A* também foram utilizadas em estudos de proteômica. A análise comparativa do perfil protéico de folhas de soja BR16(P58) GM e BR16 não GM mostrou uma maior quantidade de “spots” sob condições de déficit hídrico, evidenciando um processo de regulação gênica resultante em um provável aumento na tradução de proteínas envolvidas no metabolismo de tolerância.

Os resultados advindos da identificação de “spots” de potenciais proteínas diferencialmente expressas em resposta ao déficit hídrico poderão ser utilizados como ferramentas biotecnológicas, que vão desde o uso de marcadores moleculares para o auxílio de programas de melhoramento até o desenvolvimento de estratégias moleculares para geração de plantas geneticamente modificadas que auxiliem na solução de problemas da cultura da soja conferindo características agrícolas, ambientais e mercadológicas desejáveis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, A. A. Post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. *Nature*, 402: 715–720, 1999.

AGARWAL, P. K.; AGARWAL, P.; REDDY, M. K.; SOPORY, S. K. Role of DREB transcription factors in abiotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep.*, 25: 1263-1274, 2007.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373-399, 2004.

AVONCE, N.; LEYMAN, B.; MASCORRO-GALLARDO, J. O.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M.; ITURRIAGA, G. The Arabidopsis Trehalose-6-P Synthase AtTPS1 Gene Is a Regulator of Glucose, Abscisic Acid, and Stress Signaling. *Plant Physiology*, 136: 3649-3659, 2004.

ASSAD, E.; PINTO, H. S. Aquecimento Global e Cenários Futuros da Agricultura Brasileira. Embrapa Agropecuária e Cepagri/Unicamp. São Paulo, 2008.

BAKER, J.; STEELE, C.; DURE, L. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Mol Biol.*, 11: 277-291, 1988.

BARNABÁS, B.; JAGER, K.; FEHÉR, A. The effect of drought and heat stress on reproductive process in cereals. *Plant Cell and Environmet.*, 31: 11-38, 2008.

BATES, B. C.; KUNDZEWICZ, Z. W.; WU, S.; PALUTIKOF, J. P. Climate Change and Water. IPCC Secretariat, Geneva, p. 210, 2008.

BELIN, C.; THOMINE, S.; SCHROEDER, J. I. Water Balance and the Regulation of Stomatal Movements. *Abiotic Stress Adaptation in Plants.*, 3: 283-305, 2010.

BHATTACHARJEE, S. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*, 89: 7, 2005.

BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. A soja no Brasil: história e estatística. Londrina, EMBRAPA- Cnpso. (EMBRAPA- Cnpso. Documentos, 21) p. 61, 1987.

BOWLER, C.; FLUHR, R. The role of calcium and activated oxygen as signals for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Science*, 5: 241-246, 1992.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.*, 103: 1035-1040, 1993.

BRAY, E. A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 55, 407: 2331-2341, 2004.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25: 169-193, 2002.

CAMPBELL, M. K. Biochemistry. Fort Worth, USA: Harcourt Brace Jovanovich College Publishers, p.622, 1991.

CASAGRANDE, E. C. Expressão Gênica Diferencial durante Déficit Hídrico em Soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2001.

CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU, J-K. Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants. *Crop Science*, 45: 437-448, 2005.

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

CLOSE, T. J.; WANAMAKER, S.; CALDO, R. A.; TURNER, S. M.; ASHLOCK, D. A.; DICKERSON, J. A.; WING, R. A.; MUEHLBAUER, G. J.; KLEINHOF, A.; WISE, R. P. A new resource for cereal genomics: 22K barley GeneChip comes of age. *Plant Physiology*, 134: 960-968, 2004.

CODEX ALIMENTARIUS. Foods Derived from Biotechnology. Second Edition. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rome, Italy, 2009.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo levantamento, julho 2010 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab, 2010.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. 2010. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/ef91aacd94abfcdc6e9a38914a87ccb8..pdf>

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

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

CHRISTMANN, A.; HOFFMANN, T.; TEPLOVA, I.; GRILL, E.; MÜLLER, A. Generation of Active Pools of Abscisic Acid Revealed by In Vivo Imaging of Water-Stressed Arabidopsis. *Plant Physiology*, 137: 209-219, 2005.

DALL'AGNOL, A.; LAZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H. Desenvolvimento, Mercado e Rentabilidade da Soja Brasileira. Circular Técnica 74. Embrapa – Londrina PR. p. 74, 2010.

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

ELBEIN, A. D.; PAN, Y. T.; PASTUSZAK, I.; CARROLL, D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13, 4: 17R-27R, 2003.

EMBRAPA. Tecnologias de produção de soja da região central do Brasil. 2004. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>

EMBRAPA. V Plano-Diretor da Embrapa: 2008-2011-2023./Brasília-DF, p. 44, 2008.

EMBRAPA. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil – 2009 e 2010. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados : Embrapa Agropecuária Oeste, (Embrapa Soja, Sistemas de Produções, 13), p. 262, 2009.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2010. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=25&cod_pai=29

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2010. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2009/junho/2a-semana/presidente-do-jircas-destaca-importancia-de-desenvolver-cultivares-tolerantes-a-seca>

ESTEVEZ, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. *Rev. Nutr.*, 14, 1: 43-52, 2001.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEURMAIER, N. Rendimento de genótipos semiprecoces de soja submetidos ou não a irrigação. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 5, 1: 57, 1993.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEURMAIER, N.; TOBITA, S.; DE ALMEIDA, I. R. Restrições da disponibilidade hídrica à obtenção de elevados rendimentos de grãos de soja. Livro de Resumos do IV Congresso Brasileiro de Soja Londrina-PR, Embrapa-Soja, 2006.

FLAGELLA, Z.; CAMPANILE, R. G.; STOPPELLI MC, DE C. A.; DI FONZO, N. Drought tolerance of photosynthetic electron transport under CO₂-enriched and normal air in cereal species. *Physiol. Plant*, 104: 753-759, 1998.

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

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*, 23: 575-584, 1989.

GILMOUR, S. J.; ZARKA, D. G.; STOCKINGER, E. J.; SALAZAR, M. P.; HOUGHTON, J. M.; THOMASHOW, M. F. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *Plant Journal*. 16: 433-442, 1998.

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

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basic of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature*, 2: 140-150, 2003.

GONZÁLEZ-GUZMÁN, M.; ABIA, D.; SALINAS, J.; SERRANO, R.; RODRÍGUEZ, P. L. Two New Alleles of the *abscisic aldehyde oxidase 3* Gene Reveal Its Role in Abscisic Acid Biosynthesis in Seeds. *Plant Physiology*, 135: 325-333, 2004.

HAO, D.; YAMASAKI, K.; SARAI, A.; OHME-TAKAGI, M. Determinants in the sequence specific binding of two plant transcription factors, CBF1 and NtERF2, to the DRE and GCC motifs. *Biochemistry*, 41: 4202-4208, 2002.

HARTUNG, W.; SCHILLE, P.; DIETZ, K. J. The physiology of poikilohydric plants. *Progress in Botany*, 59: 299-327, 1998.

HAYASHI, H. A.; MUSTARDY, L.; DESHNIUM, P.; IDA, M.; MURATA, N. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase: accumulation of glycine betaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *The Plant Journal*, 12: 133-142, 1997.

HAYWARD-LESTER, A.; OEFNER, P. J.; SABATINI, S.; DORIS, P. A. Accurate and absolute quantitative measurement of gene expression by single-tube RT-PCR and HPLC. *Genome Research*, 5: 494-499, 1995.

HE, J. X.; WANG, J.; LIANG, H. G. Effects of water stress on photochemical function and protein metabolism of photosystem II in wheat leaves. *Physiol. Plant*, 93: 771-777, 1995.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986-994, 1996.

HONG, C. H. J.; HA, J.; KANG, J.; KIM, S. Y. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Bio. Chem.*, 275: 1723-1730, 2000.

IBGE. (2006) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1464&id_pagina=1

ISAAA. Pocket K No. 1 Questions and Answers About Genetically Modified Crops: A Pocketful of Information. 2009. Disponível em: <http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/>

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009 The first fourteen years, 1996 to 2009. ISAAA Brief 41-2009: Executive Summary, 2009.

JAVOT, H.; MAUREL, C. The Role of Aquaporins in Root Water Uptake. *Annals of Botany*, 90: 301-313, 2002.

JENSEN, M. K.; HAGEDORN, P. H.; DE TORRES-ZABALA, M.; GRANT, M. R.; RUNG, J. H.; COLLINGE, D. B.; LYNCKJAER, M. F. Transcriptional regulation by an NAC (NAM-ATAF1,2-CUC2) transcription factor attenuates ABA signalling for efficient basal defence towards *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 56, 6: 867-80, 2008.

JOFUKU, K. D.; DEN BOER, B. G. W.; VAN MONTAGU, M.; OKAMURO, J. K. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell*, 6: 1211-1225, 1994.

JOHNSON, A. P. Mass spectrometry for protein and peptide characterization. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 868-884, 2001.

JUNG, C.; SEO, J. S.; HAN, S. W.; KOO, Y. J.; KIM, C. H.; SANG, I. K.; SONG, S. I.; NAHM, B. H.; CHOI, Y. D.; CHEONG, J. J. Overexpression of *AtMYB 44* Enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Phys.*, 146: 623 – 635, 2008.

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

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 America Inc.*, 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*, 45, 3: 346-350, 2004.

KATSUHARA, M.; HANBA, Y. T. Barley plasma membrane intrinsic proteins (PIP Aquaporins) as water and CO₂ transporters. *Pflügers Arch – Eur. J. Physiol.*, 456: 687–691, 2008.

- KAWASAKI, S.; BORCHERT, C.; DEYHOLOS, M.; WANG, H.; BRAZILLE, S.; KAWAI, K.; ET AL. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell*, 13: 889–905, 2001.
- KUIPER, H. A.; KLETER, G. A.; NOTEBORN, H. P. J. M.; KOK, E. J. Assessment of food safety issues related to genetically modified foods. *Plant J.*, 27, 6: 503–528, 2001.
- KLEIN, C. A.; SEIDL, S.; PETAT-DUTTER, K.; OFFNER, S.; GEIGL, J. B.; SCHMIDTKITTLER, O.; ENDLER, N.; PASSLICK, B.; HUBER, R. M.; SCHLIMOK, G.; BAEUERLE, P. A.; MULLER, G. R. Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nature Biotechnology*, 20: 387–392, 2002.
- KOIWAI, H.; NAKAMINAMI, K.; SEO, M.; MITSUHASHI, W.; TOYOMASU, T.; KOSHIBA, T. Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134: 1697–1707, 2004.
- KRAMER, M. G.; REDENBAUGH, K. Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The FLAVR SAVR tomato story. *Euphytica*, 79: 293-297, 1994.
- KUO, W. P.; JENSSEN, T-K.; BUTTE, A. J.; OHNO-MACHADO, L.; KOHANE, I. S. Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. *Bioinformatics*, 18: 405–412, 2002.
- LAWLOR, D. W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany*, 89: 871-885, 2002.
- LAWLOR, D. W.; CORNING, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficit in higher plants. *Plant, Cell and Environment*, 25: 275-294, 2002.
- LI, J.; GONG, X.; LIN, H.; SONG, Q.; CHEN, J.; WANG, X. DGP1, a drought-induced guard cell specific promoter and its function analysis in tobacco. *Sci China Life Sci.*, 48: 181-196, 2005.
- LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat shock proteins. *Annual Review of Genetics*, 22: 631-677, 1988.
- LIU, F.; JENSEN, C. R.; SHAHANZARI, A.; ANDERSEN, M. N.; JACOBSEN, S. E. ABA regulated stomatal control and photosynthetic water use efficiency of potato (*Solanum tuberosum* L.) during progressive soil drying. *Plant Science*, 168: 831-836, 2005.
- LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction

pathways in drought- and lowtemperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 1391-1406, 1998.

MANDARINO, J. M. G.; BORDIGNON, J. R.; CARRÃO-PANIZZI, M.; BENASSI, V. *Folder Soja e saúde*, Número 4, 2003.

MARSHALL, A. 2nd-generation GM traits progress. *Nature*, 28, 4: p. 306, 2010.

MARTRE, P.; MORILLON, R.; BARRIEU, F.; NORTH, G. B.; NOBEL, P. S.; CHRISPPEELS, M. J. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiology*, 130: 2101-2110, 2002.

MAPA. Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011 / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Produção e Agroenergia. 2. ed. rev. - Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, p. 110, 2006.

MARUYAMA, K.; SAKUMA, Y.; KASUGA, M.; ITO, Y.; SEKI, M.; GODA, H.; SHIMADA, Y.; YOSHIDA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *The Plant Journal*, 38, 6: 982-993, 2004.

MCKERSIE, B. D.; BOWLEY, S. R.; JONES, K. S. Winter Survival of Transgenic Alfalfa Overexpressing Superoxide Dismutase. *Plant Physiology*, 119: 839-847, 1999.

MESQUITA, R. Caracterização fisiológica e análise proteômica diferencial de genótipos de soja submetidos a déficit hídrico. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

MESSINA, M. Overview of research on the relationship between soya intake and breast cancer and potential mechanisms by which soya affects breast cancer risk. In: Proceedings/ VII World Soybean Research Conference, IV International Soybean Processing and Utilization Conference, III Congresso Brasileiro de Soja edited by Fávio Moscardi (*et al.*). – Londrina, Embrapa Soybean. 661-673, 2004.

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

MISSÃO, M. R. Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. Maringá Management: *Revista de Ciências Empresariais*, 3(1): 7-15, 2006.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*. 11, 1: 15-19, 2006.

MOCHIDA, K.; YOSHIDA, T.; SAKURAI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K.; TRAN LAM-SON, P. In silico Analysis of Transcription Factor Repertoire and Prediction of Stress Responsive Transcription Factors in Soybean. *DNA Research*, 16: 353–369, 2009.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; BESPALHOK, J. C.; KOBAYASHI, A. K.; PILEGGI, M.; PEREIRA, F. P. P.; VIEIRA, L. G. E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Science*, 167: 1375-1381, 2004.

MPOG. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. 2010. Disponível em: <http://clippingmp.planejamento.gov.br/cadastros/noticias/2010/7/12/usda-preve-estoque-de-soja-menor-nos-eua>

MULLER, P.; LI, X-P.; NIYOGI, K. K. Non-photochemical quenching: a response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125: 1558-1566, 2001.

NAKASHIMA, K.; KIYOSUE, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A nuclear gene, *erd1* encoding a chloroplast targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 12: 851–861, 1997.

NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular Studies on Stress-Responsive Gene Expression in *Arabidopsis* and Improvement of Stress Tolerance in Crop Plants by Regulon Biotechnology. *Jarq.*, 39: 221-229, 2005.

NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. *Physiologia Plantarum*, 126: 62–71, 2006.

NANJO, T.; KOBAYASHI, M.; YOSHIBA, Y.; KAKUBARY, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 461: 205-210, 1999.

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

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

OECD. Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing *Bacillus thuringiensis* - Derived Insect Control Protein. 2007. Disponível em: [http://appli1.oecd.org/olis/2007doc.nsf/linkto/env-jm-mono\(2007\)14](http://appli1.oecd.org/olis/2007doc.nsf/linkto/env-jm-mono(2007)14).

OHME-TAKAGI, M.; SHINSHI, H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, 7: 173-182, 1995.

OKAMURO, J. K.; CASTER, B.; VILARROEL, R.; VAN MONTAGU, M.; JOFUKO, K. D. The AP2 domain of APETALA defines a large and new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94: 7076-7081, 1997.

OLIVEIRA, E. M. M.; WATANABE, E. Revisão: Segurança Alimentar de Produtos derivados da Biotecnologia. *Braz. J. Food Technol.*, 7, 2: 201-213, 2004.

OONO, Y.; SEKI, M.; NANJO, T.; NARUSAKA, M.; FUJITA, M.; SATOH, R.; SATOU, M.; SAKURAI, T.; ISHIDA, J.; AKIYAMA, K.; LIDA, K.; MARUYAMA, K.; SATOH, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Monitoring expression profiles of Arabidopsis gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA Microarray. *The Plant Journal*, 34: 868-887, 2003.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405:837-846, 2000.

PANIKULANGARA, T. J.; EGGERS-SCHUMACHER, G.; WUNDERLICH, M.; STRANSKY, H.; SCHOFFL, F. Galactinol synthase1. A Novel Heat Shock Factor Target Gene Responsible for Heat-Induced Synthesis of Raffinose Family Oligosaccharides in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 136: 3148-3158, 2004.

PATTANAGUL, W.; MADORE, M. A. Water Deficit Effects on Raffinose Family Oligosaccharide Metabolism in Coleus. *Plant Physiology*, 121: 987-993, 1999.

PELLEGRINESCHI, A.; RIBAUT, J. M.; TRETOWAN, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; HOISINTONG, D. Progress in the genetic engineering of wheat for water-limited conditions. *JIRCAS Working Report*, 55-60, 2002.

PIERIK, R.; SASIDHARAN, R.; VOESENEK, L. C. J. Growth Control by Ethylene: Adjusting Phenotypes to the Environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26: 188-200, 2007.

PITOL, C.; BROCH, D. L. Soja mais produtiva e tolerante a seca. In: Tecnologia e Produção; Soja e Milho (2008/2009). Fundação MS, p. 59-63, 2008.

PORCEL, R.; GÓMEZ, M.; KALDENHOFF, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Impairment of NtAQP1 gene expression in tobacco plants does not affect root colonization pattern by arbuscular mycorrhizal fungi but decrease their symbiotic efficiency under drought. *Mycorrhiza*, 15: 417-423, 2005.

PRESTON, G. M.; CARROLL, T. P.; GUGGINO, W. B.; AGREE, P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 proteins. *Science*, 256: 385-387, 1992.

QIN, F.; SAKUMA, Y.; JIE, L.; QIANG, L.; YI-QIN, L.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Cloning and Functional Analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol.*, 45: 1042-1052, 2004.

RIECHMANN, J.L.; MEYEROWITZ, E.M. The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol. Chem.* 379: 633-646, 1998.

ROLLA, A. A. P. Desenvolvimento e validação de um método de determinação do número de cópias transgenes no genoma da soja por PCR quantitativo. Dissertação. Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. 2009.

Root, T. L.; Price, J. T.; Hall, K. R.; Schneider, S. H.; Rosenzweig, C.; Pounds, A. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, 421: 57-60, 2003.

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

SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional Analysis of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A, involved in Drought-Responsive gene expression. *The Plant Cell*, 18: 1292-1309, 2006.

SAKUMA, Y.; LIU, Q.; DUBOUZET, J. G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290: 998-1009, 2002.

SEO, M.; PEETERS, A. J.; KOIWAI, H.; ORITANI, T.; MARION-POLL, A.; ZEEVAART, J. A.; KOORNNEEF, M.; KAMIYA, Y.; KOSHIBA, T. The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves, 2000.

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*, 3: 217-223, 2000.

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

SINGH, K. B.; FOLEY, R. C.; ONATE-SANCHES, L. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Plant Biol.*, 5: 430 – 439, 2002.

SOCIETY OF TOXICOLOGY. The Safety of Genetically Modified Foods Produced through. *Biotechnology Toxicological Sciences*, 71: 2-8, 2003.

STOLF, R. Avaliações morfo-anatômicas, ecofisiológicas e expressão gênica diferencial em duas cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], durante períodos de déficit hídrico. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, 2005.

STOLF, R. Identificação e análise da expressão de genes relacionados com tolerância à seca em soja através de microarranjos de DNA e PCR em tempo real. Tese doutorado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2007.

STOCKINGER, E. J.; GILMOUR, S. J.; THOMASHOW, M. F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94: 1035-1040, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3ª edição. Porto Alegre.: Artmed, 2004.

TAJI, T.; OHSUMI, C.; IUCHI, S.; SEKI, M.; KASUGA, M.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Important roles of drought and cold inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The plant Journal*, 29: 417-426, 2002.

TALLA, E.; TEKAIA, F.; BRINO, L.; DUJON, B. A novel design of whole-genome microarray probes for *Saccharomyces cerevisiae* which minimizes cross-hybridization. *BMC Genomics*, 4, 38: 1471-1475, 2003.

TARCZYNSKI, M. C.; JENSEN, R. G.; BOHNERT, H. J. Stress protection of transgenic tobacco by production of osmolyte mannitol. *Science*, 259:508–510, 1993.

TAYLOR, S. L.; HEFLE, S. L. Current reviews of allergy and clinical immunology. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 107, 5: 765-771, 2001.

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*, 97: 11632-11637, 2000.

USDA - United States Department Of Agriculture. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>. 2009.

VALLIYODAN, B.; NGUYEN, H. T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Opinion in Plant Biology*. 9, 2: 189-195, 2006.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218: 1-14, 2003.

WANG, W.; VINOCCUR, B.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic response. *Trends Plant Science*, 9: 244-252, 2004.

WEMA. African Agriculture Technology Foundation. Disponível em: <http://www.aatf-africa.org/>, 2010.

WILKINSON, S.; DAVIES, J. W. Manipulation of the apoplastic pH of intact plants mimics stomatal and growth responses to water availability and microclimatic variation. *Journal of Experimental Botany*, 59: 619-631, 2009.

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

XU, C.; GARRETT, W. M.; SULLIVAN, J.; CAPERNA, T. J.; NATARAJAN, S. Separation and identification of soybean leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Phytochemistry*, 67: 2431-2440, 2006.

YAMADA, M.; MORISHITA, H.; URANO, K.; SHIOZAKI, N.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K.; YOSHIBA, Y. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *Jour. Exp. Bot.*, 417, 1975-1981, 2005.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stress. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 781-803, 2006.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; KASUGA, M.; LIU, Q.; NAKASHIMA, K.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; NAKASHIMA, K.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; SHINWARI, Z. K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K. Biological mechanisms of drought stress response. *JIRCAS Working Report*, 1-8, 2002.

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

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of Arabidopsis thaliana and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.*, 236: 331-340, 1993.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; KOIZUMI, M.; URO, S.; SHINOZAKI, K. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in Arabidopsis thaliana: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol.*, 33, 3: 217-224, 1992.

ANEXOS

ANEXO I
CURRICULUM VITAE

CURRICULUM VITÆ

BENEVENTI, M. A.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Magda Aparecida Beneventi.

Local e data de nascimento: Londrina, Paraná, Brasil, 03/11/1978.

Endereço profissional: Embrapa Cenargen, lab. 05, final W5, s/nº, Brasília, DF, 70770-900.

Telefone profissional: (61)3448-4705.

E-mail: mabeneventi@gmail.com

2. FORMAÇÃO

Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Filadélfia - UNIFIL, 2000-2003; Mestrado em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Estadual de Londrina – UEL, 2004 - 2006.

3. ESTÁGIOS

3.1 UNIFIL, 2002, estágio de iniciação científica na área de citologia de nematóides sob orientação do Prof Dr. Tadeu Elisbão, realizado pelo Instituto Agrônômico do Paraná IAPAR e Centro Universitário Filadélfia.

3.2 EMBRAPA SOJA, 2002-2003, bolsa de iniciação científica do CNPq, sob orientação do Dr. João Flávio Veloso. Colaboradora na área de nematologia, biotecnologia vegetal e marcadores moleculares.

3.3 EMBRAPA SOJA - UEL, 2004-2006, mestrado em genética e biologia molecular pela UEL e parte experimental desenvolvida na Embrapa Soja, sob orientação do Dr. Alexandre Lima Nepomuceno com bolsa de pós-graduação concedida pelo Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS). Trabalho realizado na área de transformação de plantas sob o título de “Transformação genética em soja por inserção da construção gênica contendo a região promotora do gene *RD29A* e a região codante do gene *DREB1A* de *Arabidopsis thaliana*, visando tolerância à seca”.

3.4 EMBRAPA CENARGEN - EMBRAPA SOJA - UFRGS, 2006 – 2010, doutorado em biologia celular e molecular pela UFRGS e parte experimental desenvolvida na Embrapa Cenargen e Embrapa Soja, sob orientação da Dra. Fátima Grossi e Dr. Alexandre Lima Nepomuceno, respectivamente. Trabalho realizado na área de biossegurança alimentar, transformação de plantas e proteômica.

3.5 EMBRAPA CENARGEN – 2010, bolsista CNPq no projeto GENOSOJA sob orientação da Dra. Maria Fátima Grossi de Sá. Desenvolvimento de trabalhos na área de transcrito de soja, para a identificação de genes de defesa em resposta a infecção por nematóides.

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

5.1 MARTINS, P. K.; JORDAO, B. Q.; YAMANAKA, N.; FARIAS, J. R. B.; **BENEVENTI, M. A.**; BINNECK, E.; FUGANTI, R.; STOLF, R.; NEPOMUCENO, A. L. Differential gene expression and mitotic cell analysis of a drought tolerant soybean cultivar under two water deficit induction systems. *Genetics and Molecular Biology*, 31: 512-521, **2008**.

5.2 YAMANAKA, N.; **BENEVENTI, M. A.**; POLIZEL, A. M.; STOLF, R.; ROLLA, A. A. P.; LEMOS, N. G.; MARIN, S. R. R.; SILVEIRA, C. A.; TOBITA, S.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L. Development of Transgenic Soybean Tolerant to Drought Stress. *JIRCAS Working Report*, 51: 21-26, **2006**.

5.3 FUGANTI, R. ; SILVA, J. F .V. ; **BENEVENTI, M. A.** ; ARIAS, C. A. A. ; MARIN, S. R. R. ; BINNECK, E. ; NEPOMUCENO, A. L. . Identificação de marcadores Moleculares de Microsatelites para Seleção de Genótipos de Soja Resistentes a *Meloidogyne Javanica*. *Nematologia Brasileira*, 28(2): 125-130, **2004**.

6. ARTIGOS COMPLETOS ENVIADOS PARA PUBLICAÇÃO

6.1 BENEVENTI, M. A.; NAKASHIMA, K.; YAMANAKA, N.; BINNECK, E.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, M. C. N.; NEUMAIER, N. ; ABDELNOOR, R. V.; MARCELINO F. C.; MARIN, S. R. R.; SILVEIRA, C. A.; FUGANTI, R.; STOLF-MOREIRA, R.; SALINET, L.; ROLLA, A. A. P.; POLIZEL, A. M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; GROSSI DE SA, M. F.; NEPOMUCENO, A. L. Improving drought stress tolerance in soybean by introgression of the *RD29A: AtDREB1A* construct. *BMC Biotechnology*, **2010**.

6.2 POLIZEL, A. M ; MEDRI, M. E.; NAKASHIMA, K.; KANAMORI, N.; YAMANAKA, N.; FARIAS, J. R. B.; MARIN, S. R. R.; ABDELNOOR, R. V.; MARCELINO-GUIMARAES, F. C.; FUGANTI, R.; RODRIGUES, F. A.; STOLF-MOREIRA, R.; **BENEVENTI, M. A.;** ROLLA, A. A. P.; NEUMAIER, N.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A. L. Molecular, anatomical and physiological properties of soybean genetically modified with *rd29A:AtDREB1A* for the improvement of drought tolerance. *Planta*, **2010**

6.2 STOLF, R.; LEMOS, E. G. M.; MARCELINO F. C.; **BENEVENTI, M. A.;** YAMANAKA, N.; ROLLA, A. A. P. ; PEREIRA, S. S. ; ABDELNOOR, R. V.; OLIVEIRA, M. C. N. ; FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L. Comparison of reference genes for analysis of gene expression in drought-stressed soybean. *BMC Plant Biology*, **2010**.

6.3 OLIVEIRA, G. R.; SILVA, M. C. M.; RAMOS, H. B.; TEMPEL, N. E. Y.; FIRMINO, A. A. P.; **BENEVENTI, M. A.**; SOUZA, D. S. L.; JUNIOR, J. E. G.; JUNIOR, J. D. A.S., RIDGEND, J.; GROSSI DE SA, M. F. Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Journal of Biotechnology*, **2010**.

7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

FERREIRA, A. J.; LOURENÇO, I. T.; **BENEVENTI, M. A.**; GIROTTO, L.; NEPOMUCENO, A. L.; FRAGOSO, R. R.; GROSSI DE SÁ, M. F. Transformação genética de soja (*Glycine max*) via biobalística conferindo resistência a nematóides (*Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*). III Workshop de Interação Planta Praga, 2010.

SALINET, L.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; **BENEVENTI, M. A.**; ROLLA, A. A. P.; POLIZEL, A. M.; MARIN, S. R. R.; ENGELS, C.; OLIVEIRA, R. F.; OLIVEIRA, M. C. N.; NEPOMUCENO A. L. Avaliação fisiológica e agrônômica de soja geneticamente modificada visando maior tolerância à seca. In: V Congresso Brasileiro de Soja - MERCOSOJA, Goiânia. V Congresso Brasileiro de Soja – MERCOSOJA, 2009.

ROLLA, A. A. P.; **BENEVENTI, M. A.**; FUGANTI, R.; MARIN, S. R. R.; FARIAS, J. R. B.; ABDELNOOR, R.; NEPOMUCENO, A. L.; MARCELINO, F. C. Desenvolvimento e validação de um método de determinação do número de cópias de transgenes no genoma da soja por quantificação relativa por qPCR. In: V Congresso Brasileiro de Soja - MERCOSOJA, Goiânia. V Congresso Brasileiro de Soja – MERCOSOJA, 2009.

BENEVENTI, M. A.; NAKASHIMA, K.; YAMANAKA, N.; BINNECK, E.; FARIAS, J. R. ; OLIVEIRA, M. C. N.; NEUMAIER, N.; ABDELNOOR, R. V.; MARCELINO, F. C.; MARIN, S. R. R. ; SILVEIRA, C. A. ; FUGANTI, R. ; STOLF, R. ; SALINET, L ; ROLLA, A. A. P.; POLIZEL, A.; YAMAGUCHI- SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A. L. Introduction of *Arabidopsis thaliana* DREB1A/CBF3 transcription factor into soybean. In: Interdrought III, Shanghai. Anais Interdrought III. p. 133-134, 2009.

ROLLA, A. A. P.; **BENEVENTI, M. A.**; FUGANTI, R.; MARIN, S. R. R.; FARIAS, J. R. B.; ABDELNOOR, R.; NEPOMUCENO, A. L.; MARCELINO, F.C. Method validation for quantification of transgene copy number in soybean genome using qPCR relative quantification by 2-DeltaDeltaCt or 2-DeltaCt formule. In: World Soybean Research Conference VIII, Beijing. Developing a Global Soy blueprint for a Safe Secure and Sustainable Supply. Beijing : CAAS. v. 1. p. 233, 2009.

ROLLA, A. A. P.; **BENEVENTI, M. A.**; FUGANTI, R.; PEREIRA, S. S.; MARIN, S. R. R.; FARIAS, J. R. B.; LOPES, V. S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; BINECCK, E.; ABDELNOOR, R.; NEPOMUCENO, A. L.; MARCELINO, F. C. Quantification of transgene copies in soybean genome using quantitative real time PCR through absolute and relative methodologies. In: II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, Búzios. II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2009.

BENEVENTI, M. A.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NAKASHIMA, K.; NEPOMUCENO, A. L.; MARCELINO, F. C.; ROLLA, A. A. P.; de Sá Mandel, S.M.; OLIVEIRA, G. R.; NAKASU, E. Y. T.; ROCHA, T. L.; GROSSI DE SA, MF. Molecular Analysis and biosafety of transgenic soybean drought tolerance. In: II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, Búzios. II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2009.

OLIVEIRA, G. R., **BENEVENTI, M. A.**, & GROSSI DE SÁ, M. F. IMPROVING CRY TOXIN ACTIVITY TOWARDS COTTON BOLL WEEVIL (*Anthonomus grandis*). In: II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, Búzios. II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2009.

ROLLA, A. A. P.; **BENEVENTI, M. A.**; FUGANTI, R.; MARTINS, M. T. B.; PEREIRA, S. S.; RUBIRA, A. P. R.; MARIN, S. R. R.; FARIAS, J. R. B.; SILVEIRA, C. A.; BINECCK, E.; ABDELNOOR, R.; MARCELINO, F. C.; NEPOMUCENO, A. L. Quantificação do número de cópias de inserções transgenes no genoma da soja por pcr quantitativo via quantificação absoluta e relativa. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, Salvador. 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008.

ROLLA, A. A. P.; STOLF, R.; SALINET L.; PEREIRA S. S.; **BENEVENTI, M. A.**; YAMANAKA, N.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L. Avaliação de Parâmetros Fisiológicos em Eventos de Soja Geneticamente Modificados Com a Construção *rd29A:DREB1A*. In: 4o

Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, São Lourenço-MG. Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2007.

PEREIRA, S. S.; STOLF, R.; ROLLA, A. A. P.; POLIZEL, A. M.; **BENEVENTI, M. A.**; YAMANAKA, N.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; OLIVEIRA, M. C. N.; FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.. Quantificação dos níveis de expressão do gene DREB1A endógeno e do DREB1A de *Arabidopsis thaliana* introduzido em soja, sob controle do promotor estresse-induzido *rd29A*. In: o Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, São Lourenço. Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2007.

NEPOMUCENO, A. L.; FARIAS, J. R. B.; SALINET, L.; POLIZEL, A. M.; NEUMAIER, N.; **BENEVENTI, M. A.**; STOLF, R.; ROLLA, A. A. P. Engenharia genética como ferramenta no desenvolvimento de plantas adaptadas a cenários futuros de mudanças climáticas. In: XV Congresso Brasileiro de Agrometeorologia, Aracaju-SE. XV Congresso Brasileiro de Agrometeorologia, 2007.

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

POLIZEL, A. M.; SALINET, L.; STOLF, R.; **BENEVENTI, M. A.**; LEMOS, N. G.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NAKASHIMA, K.; YAMANAKA, N.; ROLLA, A. A. P.; BINECCK, E.; MARIN, S. R. R.; SILVEIRA, C. A.; MEDRI, M. E.; OLIVEIRA, M. C. N.; FARIAS, J. R. B. Quantificação de parâmetros anatômicos, fisiológicos e agrônômicos de soja transformada com a construção *RD29:DREB1A*, submetidas ao déficit hídrico. In: XI Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2007, Gramado. XI Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal.

POLIZEL, A. M.; YAMANAKA, N.; **BENEVENTI, M. A.**; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NAKASHIMA, K.; OLIVEIRA, M. C. N.; BINECCK, E.; FARIAS, J. R. B.; ABDELNOOR, R.; ROLLA, A. A. P.; STOLF, R.; LEMOS, N. G.; NEPOMUCENO, A. L. Avaliação molecular e fisiológica de soja geneticamente modificada com a construção *rd29A:DREB1A*, de *Arabidopsis thaliana*, visando tolerância à seca. In: 52º Congresso Brasileiro de Genética, Foz do Iguaçu. 52º Congresso Brasileiro de Genética, 2007.

STOLF, R.; MARCELINO, F.C.; LEMOS, E. G. M.; **BENEVENTI, M. A.**; YAMANAKA, N.; ABDELNOOR, R.; FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L. Comparison of endogenous control for Real-Time PCR gene expression analysis in soybean under water stress.. In: Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria, 2007, Vina Del Mar/Valparaiso. Anais Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria. Vina Del Mar/Valparaiso, 2007.

MORALES, A. M. A. P.; LEMOS, E. G. M.; WENDLAND, A.; FUGANTI, R.; ALVES L. C.; MARIN, ROCKENBACH S. R.; **BENEVENTI, M. A.**; SILVA, J. F. V.; ARIAS, C. A. A.; DIAS W. P.; ABDELNOOR R. V.; NEPOMUCENO A. L. Análise em soja da expressão de genes envolvidos na resistência à *Meloidogyne javanica*, através da técnica de PCR em tempo real. In: 3º Congreso de soja del Mercosur, Rosário. Soja Sudamericana Liderando el porvenir, 2006.

MORALES, A. M. A. P.; LEMOS, E. G. M.; WENDLAND, A.; FUGANTI, R.; ALVES, L. C.; MARIN, ROCKENBACH, S. R.; **BENEVENTI, M. A.**; SILVA, J. F. V.; ARIAS, C. A. A.; DIAS, W. P.; ABDELNOOR, R. V.; NEPOMUCENO, A. L. Análise em soja da expressão de genes envolvidos na resistência à *Meloidogyne javanica*, através da técnica de PCR em tempo real.. In: IV Congresso Brasileiro de Soja, Londrina. Resumos IV Congresso Brasileiro de Soja, 2006.

ROLLA, A. A. P.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Y.; YAMANAKA, N; NAKASHIMA, K.; FARIAS, J. R. B.; MARIN, S. R. R.; SILVEIRA, C. A.; LUGLLE, S. M.; **BENEVENTI, M. A.**; ABDELNOOR, R.; POLIZEL, A. M.; NEPOMUCENO, A. L. Análise da indução do promotor *rd29A* de *Arabidopsis thaliana* em soja após déficit hídrico através de ensaio histoquímico e fluorimétrico em plantas transformadas com a construção *rd29A:GUS*. In: IV congresso Brasileiro de soja, Londrina, 2006.

BENEVENTI, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; YAMANAKA, N.; SHINOZAKI, K.; NAKASHIMA, K.; BINECCK, E.; FARIAS, J. R. B.; MARIN, S. R. R.; SILVEIRA, C. A.; ROLLA, A. A. P.; ABDELNOOR, R.; POLIZEL, A. M.; LUGLLE, S. M. Transformação genética em soja pela inserção da construção gênica contendo a região promotora do gene *RD29A* e a região codante do gene *DREB1A* de *Arabidopsis thaliana*, visando tolerância à seca.. In: IV congresso Brasileiro de soja, 2006.

NEPOMUCENO, A. L.; **BENEVENTI, M. A.**; SHINOZAKI, K. YAMAGUCHI; YAMANAKA, N.; NAKASHIMA, K.; BINECCK, E.; FARIAS, J. R. B.; MARIN, S. R. R.; SILVEIRA, C. A.; LUGLLE, S. M.; ABDELNOOR, R.; ROLLA, A. A. P.; POLIZEL, A. M. Transformação genética em soja visando tolerância à seca. In: 3º Congresso de soja do mercosulRosário. Soja sudamericana liderando el porvenir. , 2006.

BENEVENTI, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; YAMANAKA, N.; SHINOZAKY, K. Y.; NAKASHIMA, K.; BINNECK, E.; FARIAS, J. R. B.; MARIN, S. R. R.; SILVEIRA, C. A. ; ROLLA, A. A. P. Transformação genética em soja (*Glycine max* (L) Merrill) visando tolerância à seca. In: 51 Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Aguas de Lindóia. 51 Congresso Brasileiro de Genética, 2005.

STOLF, R.; MEDRI, M. E.; FARIAS, J. R. B.; BINNECK, E.; LEMOS, N. G.; **BENEVENTI, M. A.**; MARIN, S. R. R.; SILVEIRA, C. A.; BROGIN, R. L.; YAMANAKA, N.; LEMOS, E. G. M.; NEPOMUCENO, A. L. Análise de expressão por PCR em tempo real e clonagem de genes induzidos sob condições de seca, em duas cultivares de soja, *Glycine max* (L.) Merrill. In: XXVII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 2005, Cornélio Procópio. XXVII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 2005.

BENEVENTI, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; YAMANAKA, N.; SHINOZAKI, K.; NAKASHIMA, K.; BINECCK, E.; FARIAS, J. R. B.; MARIN, S. R. R.; SILVEIRA, C. A.; LUGLLE, S. M.; ABDELNOOR, R.; ROLLA, A. A. P.; POLIZEL, A. M. Transformação genética de soja com promotor e fator de transcrição estresse induzidos visando tolerância à seca. In: XXVII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 2005, Cornélio Procópio. Resumos da XXVII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil. Londrina : Embrapa Soja, p. 108-109, 2005.

ROLLA, A. A. P.; NEPOMUCENO, A. L.; YAMANAKA, N.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; BINECCK, E.; FARIAS, J. R. B.; **BENEVENTI, M. A.**; SILVEIRA, C. A.; MARIN, S. R. R.; POLIZEL, A. M.; LUGLLE, S. M. Obtenção de soja geneticamente modificada por biobalística visando tolerância à seca. In: XIII Simpósio de Iniciação Científica da Unifil, Londrina. XIII Simpósio de Iniciação Científica da Unifil, 2005.

BENEVENTI, M. A.; FUGANTI, R.; SILVA, J. F. V.; ARIAS, C. A. A.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A. L. Microsatellite molecular markers associated with selection process of soybean resistant genotypes to *Meloidogyne javanica* and *Heterodera glycines*. In: VII World Soybean Research Conference/ IV International Soybean Processing and Utilization Conference/ III Brazilian Soybean Congress, Foz do Iguaçu. Abstracts of contributed papers and posters / VII World Soybean Research Conference / IV International Soybean Processing and Utilization Conference / III Congresso Mundial de Soja. Londrina-PR : Embrapa-Soja, 2004.

FUGANTI, R.; **BENEVENTI, M. A.**; SILVA, J. F. V.; ARIAS, C. A. A.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A. L. Microsatellite insertion in a heat-shock protein-promoter region (Gmhsp 17.6) in soybean plants resistant and susceptible to *M. javanica*. In: VII World Soybean Research Conference, Foz do Iguaçu. Abstracts of the VII World Soybean Research Conference. p. 321, 2004.

MORALES A. M.; FUGANTI R.; SILVA J. F. V.; NEPOMUCENO A. L.; **BENEVENTI M. A.** Genoma Funcional de Raízes de Soja Submetidas ao Ataque do Nematóide de Galhas *Meloidogyne javanica*. In: XII Simpósio de Iniciação Científica da UniFil, Londrina. XII Simpósio de Iniciação Científica da UniFil. 2004.

BENEVENTI M. A.; FUGANTI R.; ARIAS C. A. A.; MARIN S. R. R.; SHINOZAKY K. Y.; NEPOMUCENO A. L. Seleção de genótipos de Soja Resistentes a *Meloidogyne javanica* Assistida por Marcadores Moleculares. In: XI Simpósio de Iniciação Científica da UniFil, Londrina. XI Simpósio de Iniciação Científica da UniFil. 2003.

NEPOMUCENO A. L.; **BENEVENTI M. A.**; SILVA J. F. V.; BINNECK E. ; MARIN S. R. R.; SILVEIRA C. A.; MORALES A. M.; FARIAS J. R. B.; NEPOMUCENO A. L.; ARIAS C. A. A. Genômica Funcional: Tolerância á Seca e Resistência a Nematóides, em Soja. In: IX Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Atibaia. IX Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. 2003.

BENEVENTI M. A.; FUGANTI R.; ARIAS C. A. A.; MARIN S. R. R.; SHINOZAKY K. Y.; NEPOMUCENO A. L. Seleção de genótipos de Soja Resistentes a *Meloidogyne javanica* Assistida por Marcadores Moleculares. In: 49 Congresso Brasileiro de Genética, Aguas de Lindóia. 49 Congresso Brasileiro de Genética. 2003.

FUGANTI, R.; **BENEVENTI, M. A.**; SILVA, J. F. V.; ARIAS, C. A. A. ; MARIN, S. R. R. ; BINNECK, E. ; NEPOMUCENO, A. L. Inserção de Microsatélite na região promotora da proteína de choque térmico (GMHSP17 6-L). In: 49 Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia. 49 Congresso Brasileiro de Genética. 2003.

NEPOMUCENO A. L.; **BENEVENTI M. A.**; SILVA J. F. V.; BINNECK E.; MARIN S. R. R.; SILVEIRA C. A.; MORALES A. M.; FUGANTI R.; FARIAS J. R. B.; ARIAS C. A. A. Genômica Funcional em plantas de soja submetidas a estresses bióticos e abióticos. In: XX Reunião de Pesquisa de Soja da Região central do Brasil, Uberaba. XX Reunião de Pesquisa de Soja da Região central do Brasil. 2003.

BENEVENTI M. A.; SILVA J. F. V.; FUGANTI R.; ARIAS C. A. A.; MARIN S. R. R.; NEPOMUCENO A. L.; LIMA C. G. Seleção de genótipos de Soja Resistentes a *Meloidogyne javanica* Assistida por Marcadores Moleculares. In: XX Reunião de Pesquisa de Soja da Região central do Brasil, Uberaba. XX Reunião de Pesquisa de Soja da Região central do Brasil. 2003.

NEPOMUCENO A. L.; **BENEVENTI M. A.**; SILVA J. F. V.; BINNECK E.; MARIN S. R. R.; SILVEIRA C. A.; ALMEIDA A. M.; MORALES A. M.; GIACOMINI N.; FUGANTI R. Genoma Funcional de Raízes de Soja. In: XXIV Congresso Brasileiro de Nematologia, Petrolina. XXIV Congresso Brasileiro de Nematologia. 2003.

ANEXO II
CARTA DE ENCAMINHAMENTO DO MANUSCRITO

Article title: Improving Drought Stress Tolerance in Soybean by introgression of the RD29:AtDREB1A/CBF3 construct

MS ID: 6327800404433439

Authors: Magda A Beneventi, Kazuo Nakashima, Naoky Yamanaka, Jose R B Farias, Maria C N de Oliveira, Norman Neumaier, Ricardo V Abdelnoor, Francismar C Marcelino, Silvana R R Marin, Juliana Marcolino, Renata Fuganti, Renata S Moreira, Amanda A P Rolla, Adriana M Polizel, Kazuko Y Shinozaki, Maria F Grossi-de-Sa and Alexandre L Nepomuceno

Journal: BMC Biotechnology

Date: 30/ 08/ 2010

Dear Dr Nepomuceno

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the contact author. This e-mail has also been copied to each author on the paper, as well as the person submitting. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the contact author.

We will assign peer reviewers as soon as possible, and will aim to contact you with an initial decision on the manuscript shortly. The submitting author can check on the status of your manuscript in peer review at any time by logging into 'My BioMed Central' (<http://www.biomedcentral.com/my>).

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on editorial@biomedcentral.com. We would also welcome feedback about the online submission process.

Best wishes,

The BioMed Central Editorial Team

Tel: +44 (0) 20 3192 2013

e-mail: editorial@biomedcentral.com

Web: <http://www.biomedcentral.com/>