

# Crescimento de soja geneticamente modificada com os genes *AtDREB1A* e *AtDREB2A* sob déficit hídrico

BIANCO, L.F.<sup>1</sup>; CARVALHO, J.F.C.<sup>2</sup>; TERASSI, F.S.<sup>1</sup>.; SEINO, Y.W.<sup>1</sup>; TREVIZAN, F.H.<sup>1</sup>; ONOFRE, E.<sup>3</sup>; NEUMAIER, N.<sup>4</sup>; OLIVEIRA, M.C.N.<sup>4</sup>; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.<sup>4</sup>; FARIAS, J.R.B.<sup>4</sup>; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.<sup>5</sup>; NEPOMUCENO, A. L.<sup>4</sup> | <sup>1</sup>Universidade Norte do Paraná/Bolsista CNPq/PIBIC; <sup>2</sup>Bolsista/CAPES; <sup>3</sup>Universidade Estadual de Londrina; <sup>4</sup>Embrapa Soja; <sup>5</sup>Japan International Research Center for Agricultural Sciences/JIRCAS.

## Introdução

As perdas de produtividade relacionadas à seca tem sido atualmente o principal desafio para a produção de grãos. Recentemente, na safra 2011/2012, a seca nas regiões produtoras, sobretudo nos estados da Região Sul, reduziu a produção de 75 milhões de toneladas (2010/2011) para 65,6 milhões de toneladas (CONAB, 2012). Dentro deste contexto, a busca de cultivares mais tolerantes à seca tem sido foco constante de pesquisadores. A Embrapa Soja juntamente com o JIRCAS (*Japan International Research Center for Agricultural Sciences*), *University of Tokyo* e RIKEN Institute vem desenvolvendo plantas geneticamente modificadas contendo as construções DREB (*Dehydration Responsive Element Binding*). Estes fatores de transcrição, em condições de seca e calor, ativam uma cascata de genes que apresentam características de proteção das estruturas celulares durante a desidratação celular (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000). O uso de construções gênicas contendo promotores induzidos pelo estresse como o *rd29A* em combinação com fatores de transcrição tem demonstrado que é possível aumentar a capacidade das plantas em suportar períodos de déficit hídrico, sem comprometer definitivamente as características agrônômicas de interesse.

As linhagens DREB1A e DREB2A usadas no presente estudo, foram obtidas pela introdução de construções gênicas contendo o promotor

estresse-induzido *rd29A* e a região codante dos fatores de transcrição *AtDREB1A* e *AtDREB2A*, respectivamente, na cultivar convencional BR16. Análises de expressão dessas linhagens revelaram alta expressão do transgene inserido (BENEVENTI, 2006; POLIZEL, 2007; ENGELS, 2010).

O objetivo do presente estudo foi analisar o crescimento de plantas geneticamente modificadas contendo as construções *AtDREB1A* e *AtDREB2A*, de genótipo resultante do cruzamento entre plantas BR 16 e DREB1A, e das cultivares convencionais BR 16 e Embrapa 48 consideradas sensível e tolerante ao estresse hídrico, respectivamente, em resposta a três níveis de disponibilidade hídrica em condições de campo.

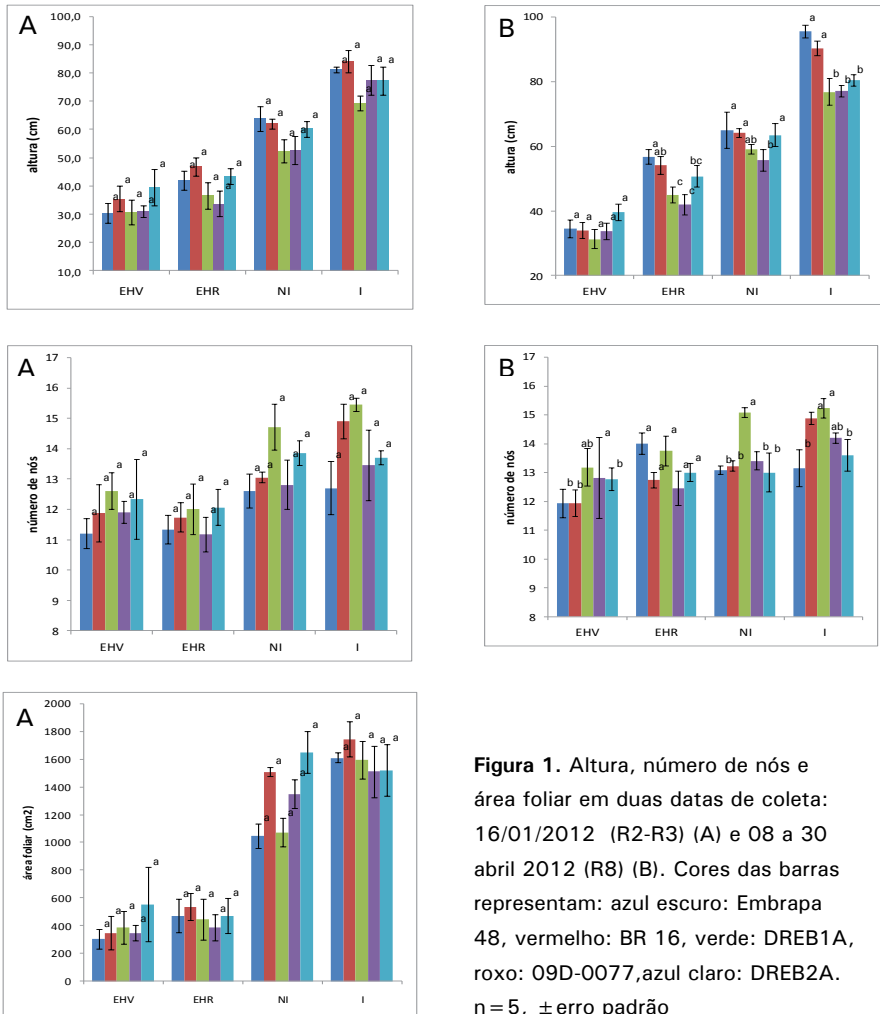
## Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Embrapa Soja, localizada em Londrina-PR durante a safra 2011/12. As condições de cultivo foram realizadas de acordo com as tecnologias de produção de soja, (Embrapa 2011). O delineamento experimental foi de blocos ao acaso em parcelas subdivididas. Os tratamentos na parcela foram: irrigado (I), não irrigado (NI) e sob coberturas móveis (CM) (*rain out shelters*); programados para fechar simulando condições de seca, no estágio vegetativo (EHV) ou no reprodutivo (EHR). Os tratamentos nas sub-parcelas foram: cultivares de soja convencionais EMBRAPA 48, BR 16, as linhagens GM DREB1A, DREB2A e genótipo resultante do cruzamento entre plantas BR 16 e DREB1A (09D-0077). Dados de altura, nº de nós, área foliar, índice de área foliar, peso fresco da parte aérea (PFPA) e peso seco da parte aérea (PSPA) foram obtidos a partir de coletas realizadas em duas datas: 16/01/2012 (plantas estavam no estágio R2-R3) e 08 a 30 abril de 2012, ou seja, quando todas as parcelas já haviam atingido o estágio R8.

O índice de área foliar (IAF) foi calculado como sendo a razão entre a área foliar e a unidade de superfície de solo ocupada por essas plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância e quando significativos, foi aplicado o teste de Duncan ( $P < 0.05$ ).

## Resultados e Discussão

Com exceção do número de nós, todos os componentes de crescimento analisados para todos os genótipos estudados tiveram valores reduzidos sob estresse hídrico. Com relação às diferenças entre genótipos dentro dos diferentes tratamentos, observou-se que na segunda coleta, as plantas DREB1A e 09D-0077 (tratamento EHR) e os genótipos DREB1A, 09D-0077 e DREB2A (tratamento I) tiveram menores alturas que BR 16 (Figura 1).



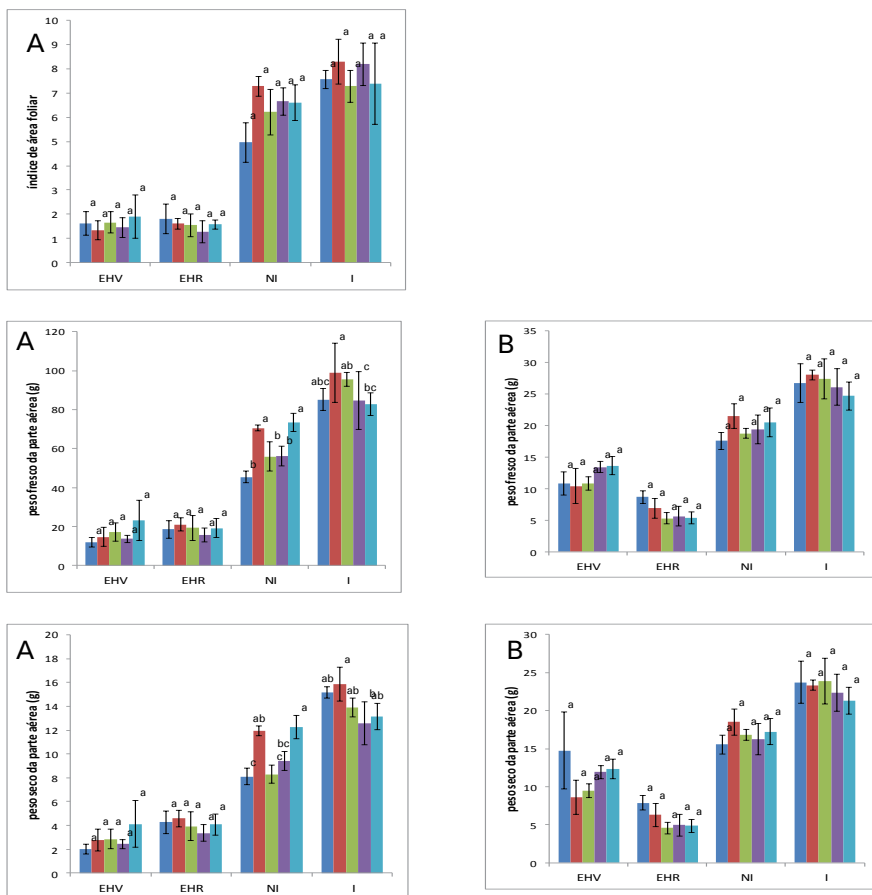
**Figura 1.** Altura, número de nós e área foliar em duas datas de coleta: 16/01/2012 (R2-R3) (A) e 08 a 30 abril 2012 (R8) (B). Cores das barras representam: azul escuro: Embrapa 48, vermelho: BR 16, verde: DREB1A, roxo: 09D-0077, azul claro: DREB2A. n = 5,  $\pm$  erro padrão

Com relação ao número de nós, na segunda coleta, as plantas DREB1A e 09D-0077 superaram os demais genótipos no tratamento EHV; DREB1A superou os demais genótipos no tratamento NI e superou as plantas DREB2A e Embrapa 48 no tratamento I (Figura 1). Com relação à área foliar (Figura 1) e IAF (Figura 2) não ocorreram diferenças entre genótipos (Figura 2). Plantas DREB1A, 09D-0077 e Embrapa 48 tiveram menor PFFA e PSPA que a BR16 no tratamento NI na primeira coleta (Figura 2). No tratamento I, os genótipos 09D-0077 DREB2A tiveram menor PF que a cultivar BR16. No tratamento I, o genótipo 09D-0077 teve menor PS que a cultivar BR16.

Estudos anteriores sobre o fenótipo de plantas DREB1A em casa de vegetação revelaram diferenças somente na altura das plantas em relação à cultivar BR 16. Assim, observa-se que em condições de campo, o peso seco e fresco dos genótipos também podem ser reduzidos em condições específicas, como no caso do tratamento NI na primeira coleta. Observou-se, entretanto, que os valores de PFFA e PSPA se igualaram na segunda coleta nos diferentes genótipos. Análises dos componentes do rendimento devem ser considerados para verificar se estas alterações no crescimento se refletirão em diferenças na produtividade.

O entendimento da base molecular e genética das respostas das plantas à limitação de água depende de análise fenotípica detalhada. Por meio desta análise, é possível, por exemplo, verificar se a inserção do gene que confere tolerância, por meio de engenharia genética, resultou em alterações no crescimento e desenvolvimento das linhagens obtidas. No presente estudo verificou-se que a transformação com a construção *AtDREB1A* resultou em redução na altura das plantas, comprovando resultados de estudos anteriores obtidos por Pagliarini et al (2011). Retardo no crescimento foi também observado em plantas de batata expressando o gene *DREB1A* sob controle do promotor *rd29A* (Behnam et al. 2006). Contudo, em estudos realizados por Kasuga et al. (1999), o uso do promotor *rd29A*, induzido por estresse ao invés do promotor 35S CaMV em *Arabidopsis*, minimizou os efeitos negativos no crescimento da planta.

O sucesso de qualquer estratégia de seleção é determinado pelo sucesso reprodutivo. Em estudos realizados por Fuganti-Pagliarini et al (2011) plantas contendo os genes *DREB1A* e *DREB2A* tiveram menores alturas, porém a produtividade dessas linhagens não foi modificada em relação á cultivar BR 16 ou Embrapa 48.



**Figura 2.** Índice de Área foliar, Peso fresco e seco da parte aérea em duas datas de coleta: 16/01/2012 (R2-R3) (A) e 08 a 30 abril 2012 (R8) (B). Cores das barras representam: azul escuro: Embrapa 48, vermelho: BR 16, verde: DREB1A, roxo: O9D-0077, azul claro: DREB2A. n = 5,  $\pm$  erro padrão

## Conclusões

O estresse hídrico no estágio vegetativo e reprodutivo afetou as características de crescimento de todos os genótipos estudados;

No estágio R2-R3, de um modo geral, foram encontrados menores valores para altura e pesos fresco e seco da parte aérea, no tratamento NI, nos genótipos: Embrapa 48/DREB1A/09D-0077 em comparação com a cultivar BR16. O genótipo 09D-0077 teve valores inferiores também no tratamento I;

No estágio R8 as características de crescimento dos diferentes genótipos se igualaram, exceto pela altura;

A transformação com a construção *AtDREB1A* resultou em redução na altura das plantas.

## Agradecimento

O projeto é financiado pela JICA (*Japan International Cooperation Agency*), JST (*Japan Science Technology*) e Embrapa.

## Referências

ACOMPANHAMENTO da safra brasileira 2012. Disponível em <http://www.conab.gov.br> > Acesso em: 26 abril 2012

BENEVENTI, M.A. **Transformação genética em soja pela inserção da construção gênica contendo a região promotora do gene rd29A e a região codante do gene DREB1A de *Arabidopsis thaliana*, visando tolerância à seca.** 126 p. Dissertação de mestrado, Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UEL, Londrina-PR, 2006.

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

ENGELS, C. **Obtenção e caracterização de plantas de soja geneticamente modificadas com o gene *AtDREB2A* visando tolerância à seca.** 125 p. Dissertação de mestrado, Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – UEL, Londrina-PR, 2006.

FUGANTI-PAGLIARINI R.; J.F.C. CARVALHO; A.A.P. ROLLA-SANTOS; C. ENGELS; M.D.C. MOLINARI; G. VASQUEZ; S.R.R. MARIN; N. KANAMORI; J.R.B. FARIAS; N. NEUMAIER; M.C.N. OLIVEIRA; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; A.L.NEPOMUCENO. **Análise Fisiológica e Agro-nômica de plantas de soja geneticamente modificadas com os genes *AtDREB1A* e *AtDREB2A* sob déficit hídrico em condições experimentais de campo.** In: Quinto Congreso de La soja Del Mercosur/Primer Foro de La Soja Asia-Mercosur. Rosario – Argentina, 2011

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.** 3:346–350, 2004

POLIZEL, A. M. **Avaliações moleculares, morfo-anatômicas e fisiológicas de soja geneticamente modificada com a construção *rd29A:DREB1A* de *Arabidopsis thaliana*, visando tolerância à seca.** 125 p. Dissertação de mestrado, Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – UEL, Londrina-PR, 2007.

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

TECNOLOGIAS de produção de soja-região central do Brasil 2011. Londrina: Embrapa Soja. Sistemas de produção, 15.