

Análise da indução do promotor *rd29A* de *Arabidopsis thaliana* em soja após déficit hídrico, através de ensaios histoquímico e fluorimétrico em plantas transformadas com a construção *rd29A:GUS*

Amanda Alves de Paiva Rolla¹; K. Yamaguchi-Shinozaki²; N. Yamanaka²; K. Nakashima²; José Renato Bouças Farias³; Silvana R. R. Marin³; C. A. Silveira³; S. M. Logle³; M. A. Beneventi⁴; Ricardo Vilela Abdelnoor³; A. M. Polizel⁴; Alexandre Lima Nepomuceno³. ¹Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL; ²Japan International Research Center for Agriculture Sciences - JIRCAS; ³Embrapa Soja, nepo@cnpso.embrapa.br; ⁴Universidade Estadual de Londrina - UEL.

Introdução

Adversidades climáticas, como o aumento de temperatura e períodos de estiagem cada vez mais freqüente tem representado um sério problema à produção agrícola em todo o mundo. No Brasil, a seca tem afetado consideravelmente a cultura de soja, promovendo perdas significativas.

A adoção de estratégias moleculares visando à obtenção de plantas com maior tolerância à seca tem sido utilizada, com sucesso, em espécies como *Arabidopsis thaliana* (Kasuga et al., 1999), trigo (Pellegrineschi, et al., 2002), tabaco (Kasuga et al., 2004) etc. Entretanto, um fator importante nestas estratégias é a utilização de construções gênicas que possuam regiões promotoras ativadas somente no momento do estresse.

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a eficiência de indução do promotor *rd29A* estresse induzido obtido de *A. thaliana* em plantas de soja, após déficit hídrico.

Materiais e métodos

A indução do promotor *rd29A* foi analisada em material proveniente da

cultivar BR16, sensível a seca, transformada com a construção *rd29A::GUS* em ensaio histoquímico e fluorimétrico de acordo com Lacorte (1999).

No ensaio histoquímico o material utilizado correspondeu às plantas nomeadas P1234, P1251 e P1263A (Fig. 1). De cada planta foi coletado um folíolo, e como controle positivo, foi coletado um folíolo de uma planta transformada com a construção *35S::GUS*. Os folíolos foram divididos em oito partes correspondendo aos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos de desidratação celular em estufa a 37°C para a indução do promotor *rd29A*. Ao final de cada tempo, foi adicionado o tampão de reação X-GLUC, e a placa contendo as amostras foi incubada a temperatura de 37°C, aproximadamente 16 horas.

Para o ensaio fluorimétrico, foram coletados três folíolos da planta *rd29A::GUS* nomeada 440. Os folíolos foram novamente divididos nos tempos de desidratação celular, colocados em placa de Petri e levados a estufa a 37°C para a indução do promotor *rd29A*. Posteriormente, foi feita a

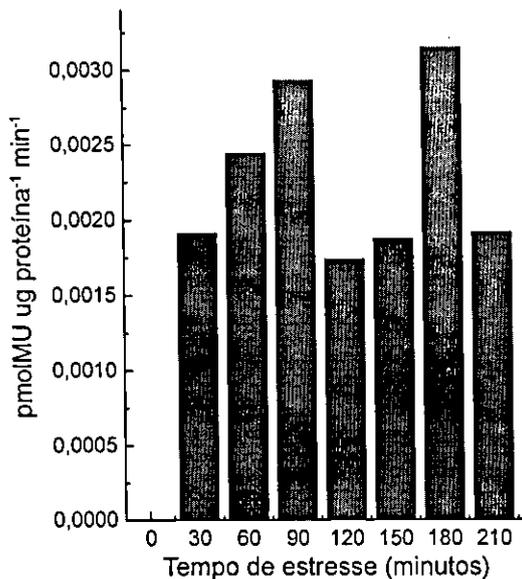


Figura 1. Atividade de GUS em folíolos da planta 440 expressa em pmolMU ug proteína⁻¹ min⁻¹ após os tempos de desidratação celular.

maceração do tecido vegetal utilizando tampão de extração. A leitura das amostras foi realizada em fluorímetro, assim como a determinação da concentração de proteína total em cada extrato e o cálculo da atividade específica de GUS.

Resultados e discussão

Através do ensaio histoquímico foi possível verificar a indução do promotor *rd29A* em tecido foliar das plantas P1234, P1251 e P1263A sob condições de desidratação celular. Diferenças de coloração entre os tempos de indução e entre as plantas também foram observadas e podem estar relacionadas ao tamanho das amostras e a idade foliar. Entretanto, número de cópias do inserto, assim como o local de inserção no genoma, podem influenciar diretamente os níveis de expressão do transgene (Reddy et al., 2003; Somers & Makarevitch, 2005).

O promotor *rd29A* foi ativado nos primeiros trinta minutos de desidratação celular e mostrou aumento crescente até noventa minutos, após esse período houve uma diminuição e a expressão máxima ocorreu em 180 minutos (Figura 1). De acordo com Yamaguchi-Shinozaki et al. (1993) a indução máxima do promotor *rd29A* em *A. thaliana* ocorre em duas fases, entretanto análises mais precisas estão sendo realizadas em soja. Os resultados observados também indicam que o promotor *rd29A* de *A. thaliana* é reconhecido pelos mecanismos de percepção de déficit hídrico presentes em soja e demonstra a rápida indução do promotor *rd29A* em situações de déficit hídrico.

Considerando a complexidade do mecanismo de resposta ao déficit hídrico, o controle da expressão gênica é uma característica importante para a transferência genética quando relacionado a fatores de transcrição que controlam a expressão de uma série de genes em resposta à seca, como DREB1A. A utilização de um promotor estresse induzido como *rd29A* pode diminuir efeitos negativos promovido pelo uso de promotores constitutivos como 35S, assim como, promover a tolerância à seca permitindo o aumento no nível de expressão apenas em condições de déficit hídrico, sem redução da produtividade da cultura.

Referências

- LACORTE, C. In: Brasileiro, A. C. M.; Carneiro, V. T. C., (Ed.) **Manual de transformação genética de plantas**, Brasília-DF, Embrapa – SPI/Embrapa-Cenargem, 1998. p. 128-141.
- 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.** p. 287-291, 1999.
- KASUGA, M.; MIURA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. **Plant Cell Physiology**, 45(3), 346-350. 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**. p. 55-60. 2002.
- REDDY, M. S. S.; DINKINS, R. D.; COLLINS, G. B. Gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. **Plant Cell Rep.** v. 21, p. 676-683, 2003.
- SOMERS, D. A.; MAKAREVITCH, I. Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes? **Current Opinion in Biotechnology** 2004, 15:126-131, 2005.
- 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.** v. 236, p. 331-340. 1993.