

Introdução de genes por biobalística em soja visando a maior tolerância à seca

Alexandre Lima Nepomuceno

José Renato Bouças Farias

Kazuko Yamaguchi - Shinozaki

Magda Aparecida Beneventi

Norman Neumaier

Naoki Yamanaka

Kazuo Nakashima

Eliseu Binneck

Silvana Regina R. Marin

Renata Stolf

Renata Fuganti

Cesar Augusto Silveira

Maria Cristina Neves de Oliveira

Ricardo Vilela Abdelnoor

Amanda Alves Paiva Rolla

Adriana Maria Polizel

Macroprograma 3: Desenvolvimento Tecnológico Incremental

Número do Projeto: 03.02.513.00

UD de Origem do Projeto: Embrapa Soja

Introdução

Em 2000, o Brasil obteve US\$ 4,2 bilhões com a exportação da soja e seus subprodutos e, em 2007, esse número alcançou US\$ 11,4 bilhões,

um incremento de 171,3 % (Cultivar, 2008). Dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior mostram que o grão tem importante participação nas exportações brasileiras. Em 2006 foram US\$ 9,3 bilhões, o que representou 6,77 % do total exportado naquele ano (Embrapa, 2008).

De janeiro a abril de 2004, a escassez de chuvas nos estados do Sul provocou na sojicultura paranaense perdas de aproximadamente 1,9 milhões de toneladas. O Estado do Rio Grande do Sul foi o mais atingido, com uma quebra de 4,1 milhões de toneladas de soja, redução de 47,8 % da safra do estado. Na região Centro-Oeste, as perdas totais foram calculadas em 3,4 milhões de toneladas grãos, sendo 2,1 milhões de toneladas de soja (Conab, 2004).

De modo geral, a primeira causa de queda da produção mundial de soja são os estresses abióticos que podem diminuir os rendimentos médios da maioria das culturas em mais de 50 % (Boyer, 1982; Bray et al., 2000). Dentre esses fatores, destaca-se a seca como o principal fator responsável pelas oscilações anuais na produção brasileira do grão (Farias et al., 2006).

O que aconteceria com a produção agrícola se as projeções de elevação de temperatura - fruto do aquecimento global - se confirmassem ao longo dos próximos anos? Em um estudo recém-concluído, pesquisadores da Embrapa Informática Agropecuária (CNPTIA) e da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) mostraram que o café, o arroz, o feijão, o milho e a soja terão suas áreas aptas ao cultivo reduzidas praticamente pela metade assim que a temperatura média da Terra estiver 5,8 °C acima da atual. Esse aumento da temperatura pode ocorrer em um prazo de 50 a 100 anos, conforme previsão do Painel Intergovernamental sobre Mudanças do Clima (IPCC, na sigla em inglês). Segundo os pesquisadores, o aumento da temperatura implicará incremento da evaporação da água do solo e da transpiração das plantas. Assim, áreas que eram próprias para o cultivo de determinada cultura deixarão de ser e outras que não eram adequadas

passarão a ser. Para a cultura da soja, aumentos de temperatura de 1 °C e 3 °C reduziram a área plantada para 2,7 e 2,1 milhões de km², respectivamente. No pior cenário, com aquecimento de 5,8 °C, a área apta para o cultivo da soja passaria a ser de 1,2 milhões de km² (Agência CT, 2005). Situações de secas muito provavelmente acompanharão este evento de aquecimento global, sinalizado nas previsões ambientais (Nepomuceno et al., 2002).

A safra de 2004/05 foi marcada por severas condições climáticas. Nos estados do Sul do Brasil, responsáveis por mais de 40 % da produção nacional de soja, as perdas somaram mais de 25 %, atingindo em perdas diretas mais de U\$ 2,32 bilhões. No Rio Grande do Sul, as perdas foram acima de 70 % na cultura da soja (Farias et al., 2005). Essa safra entrou para a história da agricultura como a pior de todos os tempos. Deixaram de ser produzidas 12,4 milhões de toneladas de grãos por causa da seca que assolou o Sul e o Centro do País. O fenômeno climático, cuja intensidade não foi prevista por nenhum instituto de meteorologia, afetou estados que concentram 60 % da produção nacional de grãos. O produto mais afetado foi a soja, com uma perda de receita da ordem de R\$ 5,4 bilhões (Portal do Agronegócio, 2005).

Entre as alternativas para amenizar os problemas da deficiência hídrica está o uso da irrigação. Entretanto, fatores econômicos e, principalmente, disponibilidade de recursos hídricos são sérios obstáculos para utilização dessa estratégia. Outra possibilidade é o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas a condições de déficit hídrico. No entanto, algumas dificuldades surgem para o melhorista na seleção de linhagens, como quantificar o efeito do estresse, seja pela falta de metodologia de avaliação, em razão da complexidade dos mecanismos envolvidos, seja pela instabilidade e intensidade da ocorrência do fator de estresse. Além disso, a tolerância à seca é considerada uma característica poligênica e difícil de ser trabalhada somente pelo melhoramento genético convencional (Beever, 2000).

Nos últimos anos, contudo, o desenvolvimento de técnicas de

biotecnologia tornou possível não somente a identificação física de genes envolvidos em uma determinada resposta fenotípica, mas também o isolamento preciso de sequências de DNA responsáveis por determinada característica. Aliadas às técnicas de transformação vegetal, essas metodologias têm permitido alterar a composição de componentes individuais de plantas, aumentando as defesas contra estresses bióticos e abióticos, indo além do que se consegue por meio de práticas de melhoramento convencional. Deste modo, a transformação genética tornou possível a introdução direta de genes que modificam características de interesse agrônomo ou agregam valor ao produto agrícola (Peña et al., 1995).

Assim, a obtenção de plantas transformadas com características de tolerância à seca e o uso correto de práticas de manejo na cultura da soja poderão contribuir para amenizar os problemas decorrentes do déficit hídrico.

Muitos métodos de transformação estão disponíveis atualmente, destacando-se o sistema via *Agrobacterium tumefaciens* e a técnica de biobalística (Aragão et al., 2000; Aragão, 2002; Rech et al., 2008), utilizados na inserção de genes envolvidos em resposta à desidratação.

Estudos recentes de regulação gênica em plantas submetidas ao déficit hídrico identificaram alguns genes que respondem à desidratação. Dentre esses genes, verificou-se a presença de uma família de genes que codificam fatores de transcrição denominados DREB (*Dehydration Responsive Element Binding protein*). Esses fatores estão envolvidos na ativação de vários outros genes que apresentam características de proteção das estruturas celulares, durante a desidratação celular (Shinozaki e Yamaguchi - Shinozaki, 2000). A introdução do fator de transcrição *DREB1A*, sob o controle do promotor estresse induzido, *rd29A*, em *Arabidopsis thaliana*, tabaco e trigo resultou em um aumento da tolerância à seca, à salinidade e ao frio nessas espécies (Kasuga et al., 1999; Hsieh et al., 2002; Kasuga et al., 2004).

Nesse sentido, a EMBRAPA, por meio de Memorando de Entendimento (MOU) e de Acordo de Transferência de Material (MTA) entre EMBRAPA e JIRCAS (*Japan International Research Center for Agricultural Sciences*), iniciou trabalhos de transformação genética de soja com construções *AtDREB1A*. O Japão, por meio do JIRCAS, desenvolveu e patenteou a tecnologia *AtDREB*, que possui elementos genéticos obtidos de *Arabidopsis thaliana*. Mesmo tendo sido obtidos de *A. thaliana*, as construções DREB (*AtDREB*) já foram testadas em espécies como arroz, trigo e tabaco com resultados positivos em relação ao aumento de tolerância à seca nessas espécies. Como resultado dessa parceria com o JIRCAS, e da aprovação do projeto no Macroprograma 3 para desenvolvimento de plantas de soja contendo construções DREB, várias linhagens de soja foram geradas e inicialmente caracterizadas. Foram feitas avaliações moleculares, fisiológicas e agrônômicas preliminares em um dos eventos, visando a analisar a eficiência da construção *rd29:AtDREB1A* em aumentar tolerância à seca em soja. As informações coletadas serviram como base para estudos em andamento que estão identificando os melhores eventos com relação à estabilidade, ao número de cópias, aos níveis de expressão, etc, e que possivelmente serão utilizados como eventos “elite” no programa de melhoramento genético de soja da EMBRAPA. Os resultados preliminares também irão embasar estudos de biossegurança para a desregulamentação de possíveis eventos comerciais.

Objetivos

a) Objetivo geral:

- Introduzir, por biobalística, a construção *rd29:DREB1A* em plantas de soja, visando à obtenção de plantas com níveis maiores de tolerância à seca.

b) Objetivos Específicos:

- Caracterizar a estabilidade genética, o número de cópias

e os níveis de expressão da construção *rd29:AtDREB1A*, introduzida em soja por biobalística.

- Caracterizar fisiológica e agronomicamente, em regime de contenção, as plantas de soja geneticamente modificadas contendo a construção *rd29:DREB1A*.
- Gerar linhagens de soja GM que possam vir a se tornar eventos “elite” para uso no programa de melhoramento de soja da Embrapa.

Resultados e Discussão

O desenvolvimento da biologia molecular associado à tecnologia de transformação genética tem permitido o desenvolvimento de estratégias que possibilitem a geração de plantas mais tolerantes a condições de déficit hídrico por meio da manipulação de genes que protegem e mantêm o funcionamento e a estrutura de componentes celulares (Wang et al., 2003; Maruyama et al.; 2004). Desse modo, por meio do processo de transformação por biobalística, foi possível introduzir a construção *rd29A:AtDREB1A* em soja, com uma eficiência de 1,8 %, considerando-se o número inicial de embriões que passaram pelo processo de transformação. A estabilidade da transformação foi confirmada por meio da transmissão do transgene em indivíduos pertencentes às gerações seguintes.

No total, foram obtidos neste projeto 17 linhagens transgênicas e, das plantas T1 testadas por PCR convencional provenientes destas linhagens, 207 plantas foram comprovadamente positivas para a construção gênica *rd29A:AtDREB1A* (Tabela 17), demonstrando a transferência do transgene entre gerações.

Tabela 17 Número de Plantas T1 positivas, provenientes de 17 linhagens transgênicas independentes, contendo a construção gênica *rd29A:AtDREB1A*.

<i>Linhas transgênicas</i>	<i>Total de plantas (T₁)*</i>	<i>Plantas Testados</i>
27 C	8	8
31 A	2	2
45 A	376	50
58 B	132	132
59 B	625	50
61 A	46	46
62 A	2	2
63 B	2	2
343	96	96
345 A	550	50
382 B	519	50
539 A	48	48
890	42	42
1142 B	3	3
1333 A	23	23
1372 A	12	12
1378 B	47	47

O tipo de promotor utilizado em uma construção genética, constitutivo ou induzido, pode interferir consideravelmente no desenvolvimento de uma Planta Geneticamente Modificada (PGM). A superexpressão de fatores de transcrição, como o gene *AtDREB1A*, pode tornar a planta tolerante ao déficit hídrico, mas com redução considerável no seu tamanho. Tal situação não seria interessante do ponto de vista da produção agrícola. Trabalhos com PGM expressando constitutivamente o gene *AtDREB1A*, sob controle do promotor 35S, promoveram efeitos negativos no crescimento de

plantas, como *A. thaliana* (Kasuga et al., 1999), tomate (Hiesh et al., 2002) e tabaco (Kasuga et al., 2004). Quando a expressão de *AtDREB1A* é controlada pelo promotor estresse induzido *rd29A*, os efeitos no desenvolvimento da planta são reduzidos, promovendo tolerância à seca, e permitindo o aumento no nível de expressão de *AtDREB1A* apenas em condições de déficit hídrico (Kasuga et al., 1999; Kasuga et. al; 2004). Outra característica a considerar é que o promotor *rd29* é induzido em todos os tecidos da planta, incluindo folhas e raízes, órgãos importantes na percepção e sinalização do estresse, durante períodos de déficit hídrico (Yamaguchi-Shinozaki, K. e Shinozaki, K., 1993).

Análises histoquímicas de indução do promotor *rd29A*, pela expressão da enzima β -glucuronidase (GUS), demonstraram que o promotor *rd29A* de *A. thaliana* foi induzido nos tecidos foliares de soja dos eventos obtidos, sob condição de desidratação.

A proteína *DREB1A* contém uma região básica na extremidade N-terminal, que atua como um sinal de localização nuclear e uma região ácida na extremidade C-terminal que funciona como um domínio de ativação transcricional em plantas (Liu et al., 1998; Yamaguchi-Shinozaki et al., 2002). Uma série de genes *downstream* ao *DREB1A* tem sido identificada e classificada em dois grupos. O primeiro grupo inclui proteínas que funcionam em resposta direta ao estresse como proteínas LEA, proteínas anticongelamento, proteínas hidrofílicas, proteínas que se ligam ao RNA, enzimas necessárias para a biossíntese de açúcares e inibidores de proteases. O segundo grupo contém fatores protéicos envolvidos na regulação do sinal de transdução, como outros fatores de transcrição e enzimas envolvidas no metabolismo de receptores presentes na membrana plasmática (Oono et. al., 2003; Maruyama et al., 2004).

Além das análises histoquímicas com GUS, a indução do promotor *rd29* também foi avaliada pelos níveis de expressão de *AtDREB1A* por PCR em Tempo Real. Folíolos das plantas transformadas com a construção *rd29:AtDREB1A* demonstraram altos níveis de mRNA *AtDREB1A* quando os tecidos foram expostos a condições de déficit hídrico (Fig. 9).

Apesar de submetidos ao mesmo período de estresse (90 min), a diferença observada entre os níveis de expressão nos folíolos de duas plantas analisadas (P58-R1 e P58-R0) pode ser relacionada às diferenças no estágio de desenvolvimento do vegetal, ao tamanho do tecido e à idade foliar (dados não apresentados). O nível de expressão de *AtDREB1A* detectado nas amostras transgênicas utilizadas como controle (tratamento 0 min) pode estar relacionado à agitação mecânica, no momento em que os folíolos foram destacados das plantas (Gilmour et al., 1998). Entretanto, trabalhos com *A. thaliana* registram que o transgene *AtDREB1A* foi expresso acima dos níveis do gene *DREB1A* endógeno mesmo em condições controles, sem a indução ao déficit hídrico (Kasuga et al., 1999), sinalizando que, mesmo em condições ótimas de água no solo, o promotor *rd29* pode apresentar indução basal (Fig. 9).

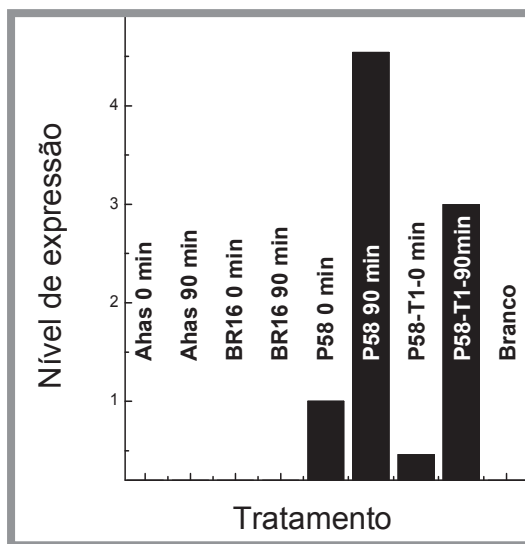


Fig. 9. Nível de expressão do transgene *AtDREB1A* em soja GM transformada com a construção gênica *rd29A:AtDREB1A* (plantas P58-T1 e P58-T0), sob condições normais e sob desidratação celular durante 90 minutos. Plantas controle: BR16 e BR16 transformada com o gene *Ahas*.

Estudo preliminar, em regime de contenção, das respostas fisiológicas e agrônômicas demonstrou que as plantas contendo a construção *rd29:AtDREB1A* apresentaram maior tolerância ao déficit hídrico em comparação com as plantas controle (variedade BR16 não transformada), que tiveram redução de ciclo e durante as horas de maior demanda evaporativa do dia murchavam mais rapidamente (Fig. 10). Parâmetros fisiológicos, como fotossíntese líquida e eficiência fotossintética, foram entre 5 % e 10 % superiores aos valores observados nas plantas-controle na maioria das datas observadas (Fig. 11). Entretanto, análises mais precisas em níveis moleculares, fisiológicos e agrônômicos estão em andamento para avaliar a eficiência dessa estratégia na redução das perdas de massa seca de plantas, ainda em regime de contenção. Solicitação de Liberação Planejada no Campo está sendo elaborada visando a testes em condições reais de campo.

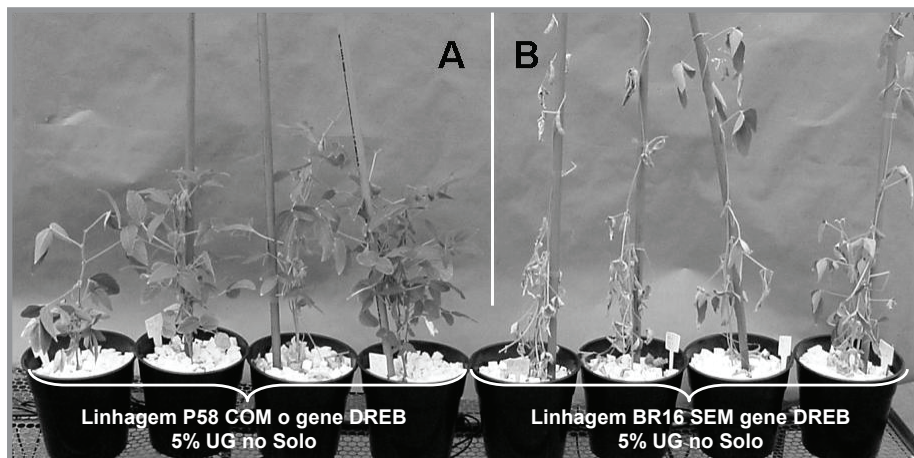


Fig. 10. Plantas de soja da variedade BR16 geneticamente modificadas COM a construção *rd29:AtDREB1A* (A) comparadas com plantas também da variedade BR16 SEM a construção *rd29:AtDREB1A* (B). As plantas desenvolveram-se em vasos com areia em umidade gravimétrica de 15 % (Capacidade de Campo). Após atingirem o estágio de desenvolvimento R1, a umidade gravimétrica no solo foi reduzida para 5 %.

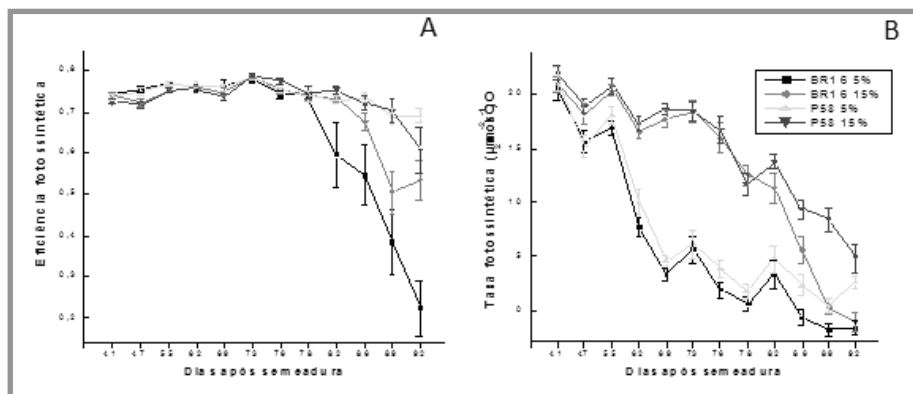


Fig. 11. Respostas fisiológicas das plantas BR16 e P58 estressadas e não-estressadas. Em A, eficiência fotossintética e em B, taxa fotossintética. Os dias após a semeadura correspondem às datas de coletas de dados. Os traços verticais entre as linhas correspondem ao erro-padrão e às diferenças observadas pelo teste de Tukey. Os pontos onde os traços não se sobrepõem indicam diferenças pelo teste de Tukey ($\leq 0,05$).

Conclusões

Nos trabalhos desenvolvidos na Embrapa Soja, a construção gênica *rd29A:AtDREB1A*, contendo o promotor estresse induzido *rd29A* e a região codante do fator de transcrição *DREB1A*, ambas de *A. thaliana*, foram introduzidas em soja, via biobalística, gerando 17 linhagens GM independentes. A expressão do gene *AtDREB1A*, em condições de déficit hídrico pela indução do promotor *rd29A*, em eventos positivos foi confirmada pela estabilidade da integração da construção no genoma da soja nas primeiras gerações (T1) provenientes desses eventos (Beneventi, 2006).

A expressão da enzima β -glucuronidase (GUS), visualizada por meio de análises histoquímicas, mostrou que o promotor *rd29A* foi induzido em tecidos foliares de soja transformada sob condição de desidratação. E os níveis de expressão do *AtDREB1A* nas plantas GM foram superiores quando essas foram submetidas a estresse hídrico.

No entanto, novos experimentos estão sendo programados visando uma caracterização agronômica e fisiológica mais detalhada dos eventos positivos. Desta maneira, se a maior tolerância ao déficit hídrico for confirmada em condições de campo, essas plantas poderão ser transferidas para programas de melhoramento de soja visando ao desenvolvimento de variedades para comercialização após a desregulamentação do evento-elite utilizado.

Referências

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

ARAGÃO, F. J. L. Development of transformation methods toward producing transgenic plants with abiotic stress tolerance. **JIRCAS Working Report**, p. 35-42, 2002.

BEEVER, D. Os transgênicos e o futuro da agricultura. **Biotecnologia e Desenvolvimento**, v.15, p.4-7, 2000.

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 a tolerância à seca**. 2006. 126 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) -Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

BOYER, J.S. Plant productivity and environment. **Science**, v. 218, p. 443–448, 1982.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Response to abiotic stress. In: Biochemistry and molecular biology of plants. **American Society of Plant Physiologists**, Rockeville, MD. p 1158-1249, 2000.

Conab - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em dez. 2004.

Cultivar – Grupo Cultivar de Publicações Ltda. Exportações do

agronegócio crescem 183% em oito anos. Fonte www.agricultura.gov.br. Disponível em: <www.grupocultivar.com.br> Acesso em mar. 2008.

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <www.cnpso.embrapa.br> . Acesso em mar. 2008.

Farias, J. R B.; Nepomuceno, A. L.; Neumaier, N.; Marion, E. Efeito de regimes pluviométricos sobre o rendimento de grãos de soja. In: **Congresso Brasileiro de Agrometeorologia**, 14, 2005. Campinas, SP. Anais. Campinas: Sociedade Brasileira de Agrometeorologia – SBA, UNICAMP: CD-ROM. 2005.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; TOBITA, S.; ALMEIDA, I. R. de. Restrições de disponibilidade hídrica à obtenção de elevados rendimentos de grãos de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 4., 2006, Londrina. **Resumos...** Londrina: Embrapa Soja, 2006. p. 32-33

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**, v. 16, p. 433-442, 1998.

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

IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em mar. 2008.

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**, v. 45, n.3, p. 346-350, 2004.

LIU, Q. M.; KASUGA, Y.; SAKUMA, H.; ABE, S.; MIURA, K. YAMAGUCHI-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**. v. 10, p.1391-1406,1998.

MARUYAMA, K.; SAKUMA, Y.; KASUGA, M.; ITO, Y.; SEKI, M.; GODA, H.; SHIMADA, Y.; YOSHIDA,S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. **The Plant Journal**, v. 38, p. 982-993. 2004.

NEPOMUCENO, A. L.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; OYA, T.; CATTELAN, A. J.; DELATTRE, N. Estratégias para amenizar impactos decorrentes das adversidades climáticas. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; SARAIVA, O. F. (Org.). **Resultados de pesquisa da Embrapa Soja - 2001: ecofisiologia e biologia molecular**. Londrina: Embrapa Soja, 2002. p. 23-24. (Embrapa Soja. Documentos, 198).

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**, v. 34, p. 868-887, 2003.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DURÁ-VILA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, v. 104, p. 183-191, 1995.

Portal do Agronegócio. Safra 2004/2005 deve registrar a maior quebra da história do país. Conab reduziu a previsão de colheita da soja e do milho. Disponível em: < www.agronegocio.goias.gov.br >. Acesso em mar. 2008.

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

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

SILVEIRA, E. Aquecimento ameaça agricultura. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 13 mar. 2005. Agência CT. Disponível em: < <http://agenciact.mct.gov.br/index.php/content/view/24233.html> >. Acesso em mar. 2008.

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

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. **Molecular & General Genetics**, v. 236, p. 331-340, 1993.

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