

ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA GENÉTICA PARA TOLERÂNCIA À SECA EM PLANTAS ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO

Alexandre Lima Nepomuceno¹, Renata Fuganti¹, Norihito Kanamori², Selma dos Santos Pereira³, Fabiana Aparecida Rodrigues¹, Norman Neumaier¹, José Renato Bouças Farias¹, Francismar Correa Marcelino¹

Segundo a OECD (2010), a produção mundial de alimentos terá que dobrar a partir dos níveis atuais considerando-se que estejam certas as projeções de que a população mundial atingirá em 2050 mais de nove bilhões de pessoas. Para que isto aconteça deverá ocorrer uma intensificação no uso da terra através da agricultura e pecuária, que junto com o crescimento industrial das cidades levará ao aumento das emissões de gases de efeito estufa. Projeções para 2050 sugerem que o aumento das temperaturas médias provocará uma ampliação na variabilidade das características climáticas de todo planeta onde secas prolongadas e/ou chuvas intensas ocorrerão com maior frequência. Isto certamente afetará a produção de alimentos, principalmente nos países maiores produtores. Assim, é essencial que estratégias de mitigação comecem a ser desenvolvidas para que nas próximas décadas seja possível manter o equilíbrio na produção mundial de alimentos. Neste contexto a ocorrência de secas será o principal fator impactante em países produtores de grãos como o Brasil, a Argentina, os EUA e o Canadá. Por exemplo, a Região Sul do Brasil, responsável por 40% da produção nacional de soja é a que mais tem sofrido com perdas devido à ocorrência de secas. Nas safras 2003/04 e 2004/05, as perdas médias decorrentes da seca, estimadas com base em safras normais em anos imediatamente anteriores ou posteriores, e com base na mesma área plantada, ficaram em torno de 24% e 44%, respectivamente. Na safra 2004/05, somente o Rio Grande do Sul perdeu em média 70% de sua produtividade. Nas últimas dez safras as perdas diretas podem ser estimadas em mais de U\$18 bilhões devido à ocorrência de secas (Farias et al, 2006).

A busca por variedades comerciais mais tolerantes a períodos de deficiência hídrica através do melhoramento clássico é relativamente difícil devido à complexidade dos mecanismos de resposta desenvolvidos pelas plantas, e neste sentido, a biotecnologia vem se tornando uma importante aliada do melhoramento genético no desenvolvimento de variedades mais adaptadas a diferentes condições de déficit hídrico. Especificamente com a engenharia genética tem sido possível desenhar estratégias moleculares que permitem que as plantas tolerem por mais tempo a indisponibilidade de água no solo. O sequenciamento completo do genoma de várias espécies, mas principalmente a compreensão da função de um gene específico e da sua interação com

¹ Embrapa Soja. Londrina, PR. E-mail: nepo@cnpso.embrapa.br

² Japan International Researcher Center for Agricultural Sciences (JIRCAS)

³ Universidade Estadual Paulista de Jaboticabal. *In memoriam*.

diversos outros, tem permitido aos pesquisadores entender a complexa malha de respostas que as plantas utilizam para se proteger de estresses ambientais. São estes conhecimentos que impulsionam o surgimento de novas ideias de engenharia genética para alterar ao nível molecular os mecanismos de defesa, visando afetar respostas fisiológicas e agrônômicas das culturas ao déficit hídrico.

Frequentemente, os genes selecionados nestes estudos visando tolerância as condições adversas do ambiente, são aqueles que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de vários osmoprotetores (proteínas LEA, *Late Embryogenesis Abundant*; prolina; glicina-betaina; rafinose; trehalose; etc), enzimas detoxificantes (superóxido dismutase, SOD; ascorbato peroxidase, APX; catalases, CAT; glutatona redutase, GR; etc), ou ainda genes que codificam Fatores de Transcrição (FT), que são proteínas envolvidas nas etapas iniciais de expressão e regulação gênica e na transdução de sinais, em resposta aos estresses.

Por participarem de etapas iniciais do processo de percepção e sinalização, os fatores de transcrição acabam regulando a expressão de vários grupos de genes. Isto torna interessante o uso de FT em trabalhos de engenharia genética onde se busca aprimorar características de tolerância à seca, salinidade, congelamento, etc, que são basicamente características poligênicas.

As respostas moleculares dos vegetais aos estresses ambientais podem basicamente ser divididas em rotas dependentes ou independentes da presença do ácido abscísico (ABA). Na via independente de ABA, foi identificada em *Arabidopsis thaliana* uma família de FT, conhecida como DREB (*Dehydration Responsive Element Binding protein* – Proteína de ligação ao elemento responsivo à desidratação; também conhecido como CBF, *C-repeat-binding factor* – fator de ligação a repetições C). As proteínas DREB atuam no topo da cascata de eventos moleculares, induzindo respostas de defesa contra a desidratação celular. Genes homólogos a essa família tem sido identificados em canola, cevada, trigo, arroz (*OsDREB1A*, *OsDREB1B*, *OsDREB1C*, *OsDREB1D* e *OsDREB2A*), soja (*GmDREBa*, *GmDREBb* e *GmDREBc*, *GmDREB2A*) e milho (*ZmDREB1A* e *ZmDREB2A*). A proteína DREB1A atua como um fator de transcrição e possui em sua estrutura o domínio ERF/AP2 (*ethylene responsive factor* – fator responsivo ao etileno/APETALA) que interage especificamente com uma região conservada denominada DRE (*Dehydration Responsive Element* - elemento responsivo à desidratação), um elemento *cis*-atuante presente na região promotora de vários genes ativados durante condições de seca (Maruyama et al., 2009).

Trabalhos científicos (Pellegrineschi, et al., 2002; Kasuga et al., 2004; Qin et al., 2007; Chen et al., 2007) têm demonstrado o potencial da manipulação genética dos genes *DREB* no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (PGM) tolerantes à seca, à alta salinidade e ao frio. A super expressão deste FT através do uso de promotores estresse induzidos (ex.:

rd29), ou constitutivos (ex.: 35S) estimula um aumento na indução de genes ativados por proteínas DREB e que estão envolvidos em mecanismos de defesa celular contra a desidratação.

Em tabaco, a construção gênica *rd29A:AtDREB1A* resultou em plantas GM mais tolerantes aos estresses de seca, alta salinidade e frio, quando comparadas às plantas controle. Plantas de tomate transformadas com a construção gênica *35S:AtDREB1B* sob condições de déficit hídrico mostraram maior tolerância à seca quando comparadas às selvagens. Já, plantas de trigo transformadas com a construção gênica *rd29A:AtDREB1A* tiveram folhas com turgor reduzido somente após 15 dias de déficit hídrico, enquanto plantas controle não foram tolerantes e morreram.

Em arroz GM expressando constitutivamente os genes *DREB1A* e *ABF3*, fatores de transcrição da via ABA-independente e ABA-dependente, respectivamente, as plantas não transformadas, após tratamento de seca, apresentaram murcha, enrolamento foliar e diminuição na clorofila mais intensamente do que as linhagens transgênicas. Após a reidratação, as PGMs apresentaram o crescimento praticamente igual ao tratamento controle e sobreviveram, enquanto as plantas não transformadas apresentaram uma redução severa no crescimento e morreram.

Ainda, em outras espécies vegetais, os genes da família DREB também aumentaram a tolerância a outros estresses ambientais, como em batata GM que apresentou maior tolerância à alta salinidade e ao frio quando transformada com a construção gênica *rd29A:AtDREB1A*. Em amendoim GM com a construção gênica *rd29A:AtDREB1A*, e submetido a 12 dias de déficit hídrico no solo, os efeitos de retardo no crescimento não foram observados e as plantas mantiveram taxas de eficiência de transpiração até 40% maiores quando comparadas com plantas controle.

Em soja, a construção gênica *rd29A:AtDREB1A*, foi introduzida com sucesso, via biobalística, em embriões de uma cultivar sensível à seca. Os resultados moleculares indicaram que o promotor *rd29A* foi ativado no tratamento de seca induzindo a expressão do FT *AtDREB1A* e, conseqüentemente, ativando em níveis mais elevados, em relação aos observados nas plantas não transformadas, genes de defesa contra a dessecação. Genes estes envolvidos na osmoproteção, e genes que, entre outras funções, codificam proteínas que atuam direta ou indiretamente na proteção de estruturas celulares garantindo o funcionamento dos processos metabólicos vitais das plantas (Polizel, 2007).

As análises de microarranjos de DNA utilizando plantas de soja GM com a construção gênica *rd29:AtDREB1A*, identificaram mais de 100 genes diferencialmente expressos nos eventos estudados, entre eles, fatores de transcrição como *bZIP*, *WRKY*, *MYB*, *NAC*; genes envolvidos com o metabolismo fotossintético, metabolismo de aminoácidos, de carboidratos, de citocromo, aquaporinas, prolina, entre outros, sendo que várias proteínas

desconhecidas também foram identificadas como reguladas pela proteína *AtDREB1A* em soja (Stolf, 2007; Stolf-Moreira, 2010).

Dados fisiológicos obtidos a partir de experimentos em casa de vegetação realizados com plantas *rd29A:AtDREB1A* positivas indicaram que as plantas transformadas apresentaram maior condutância estomática, maiores taxas fotossintética e transpiratória, além de maior eficiência fotossintética quando comparadas com plantas controle não GM, sugerindo a ativação de mecanismos que podem culminar em uma maior tolerância ao déficit hídrico (Beneventi, 2006; Polizel, 2007; Stolf, 2007).

Outro importante membro da família DREB, o gene *AtDREB2A* também vem sendo utilizado no desenvolvimento de PGMs visando tolerância a estresses ambientais. Este gene também possui o domínio conservado de ligação ao DNA, ERF/AP2 e reconhece a sequência DRE dos genes de resposta. Os genes *AtDREB2A* e *AtDREB2B* são ativados, especificamente, em resposta à seca e à salinidade, e estão localizados respectivamente, nos cromossomos cinco e três de *A. thaliana* (Nakashima et al., 2009). A partir de estudos funcionais do FT *AtDREB2A*, a deleção de domínios de regulação negativa da proteína foi realizada e uma forma constitutivamente ativa da proteína *AtDREB2A* (*AtDREB2A CA*) foi desenvolvida. A forma *AtDREB2A-CA* unida a diferentes promotores (constitutivos, *35S*; e estresse-induzidos, *rd29A*), estimulou a expressão de genes envolvidos nas defesas celulares contra a dessecação, sem promover redução no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da plantas GMs.

Análises de expressão gênica em plantas de *A. thaliana* super expressando a proteína *AtDREB2A-CA* identificaram 21 genes induzidos pela superexpressão e dentre eles, 14 genes foram induzidos exclusivamente sob déficit hídrico e seus promotores apresentavam a sequência *core* DRE (Sakuma et al., 2006). Outros trabalhos comprovaram que, em *A. thaliana*, DREB2A também induz genes de resposta ao calor (*Heatshock*), como fatores de choque térmico (ex.: *Hsf - Heat shock factors; AtHsfA3*) responsáveis pela regulação e indução de genes responsivos a altas temperaturas (ex.: *HSP, Heat Shock Proteins*, Schramm et al., 2008) e de outros genes que induzem respostas ao déficit hídrico como chaperonas moleculares, proteínas LEA, genes de síntese de açúcares osmoprotetores, dentre outros.

Outra família de fatores de transcrição que tem sido utilizada experimentalmente no desenvolvimento de PGMs mais tolerantes a estresses ambientais é a família AREB (*Abscisic acid-responsive element binding protein* – proteína de ligação ao elemento de resposta ao ácido abscísico) ou ABF (*ABRE-binding factors*). Este fator de transcrição é do tipo bZIP (*Basic domain/leucine zipper* – zíper básico de leucina) e participa da via de resposta dependente de ABA, um fitohormônio que, em condições de seca promove o fechamento estomático nas células guarda e regula a expressão de muitos genes ABA – induzidos. Esses genes possuem a sequência conservada ABRE

(*abscisic acid responsive element* – elemento de resposta ao ácido abscísico - PyACGTGGC) em suas regiões promotoras, nas quais o FT AREB se liga ativando a transcrição de genes (Furihata et al., 2006; Yoshida et al., 2010) cujos produtos funcionam na tolerância a desidratação em tecidos vegetativos e sementes. A importância da família AREB na tolerância celular ao déficit hídrico tem sido reforçada por resultados obtidos por outros pesquisadores que demonstraram que PGMs de *Arabidopsis* super expressando a forma ativa de *AREB1* apresentaram alta sensibilidade ao ABA e aumentada tolerância à seca.

Várias estratégias moleculares podem ser trabalhadas visando o aumento da capacidade das plantas em tolerar períodos de imposição de condições ambientais adversas. Entretanto, durante o desenvolvimento de variedades comerciais GM para tolerância à seca deve haver uma estreita parceria entre melhoristas, fisiologistas vegetais e biólogos moleculares, para que os ganhos observados em condições de laboratórios, realmente reflitam em redução de perdas em condições reais de lavoura. Cabe ressaltar ainda que PGMs tolerantes a estresses ambientais, como a seca, deverão ser sempre utilizadas em conjunto com outras práticas agrônômicas, como por exemplo, o plantio direto que permite uma melhor conservação da água na lavoura, e consequentemente, uma maior eficiência do uso de água pelas plantas. Ao agricultor, maior beneficiário das tecnologias desenvolvidas com o uso das técnicas de manipulação genética, recomenda-se o uso de variedades mais tolerantes aos estresses ambientais, aliado ao correto manejo das lavouras através de práticas agrícolas sustentáveis. Só assim, pequenos, médios e grandes produtores serão capazes de tirar o máximo proveito das novas tecnologias, aumentando a produção de grãos, mas principalmente reduzindo significativamente as perdas econômico-financeiras resultantes de períodos ambientais hostis.

Neste contexto, também deve ficar esclarecido que, todas as linhas de pesquisa hoje desenvolvidas nas várias instituições nacionais e internacionais de pesquisa agrícola objetivam fundamentalmente, no caso de deficiência hídrica no solo, apenas amenizar as perdas que normalmente ocorrem durante eventos de seca, fazendo com que as plantas GMs geradas sejam capazes de tolerar períodos mais prolongados de seca, até que uma nova chuva ocorra, com o retorno do ambiente favorável ao desenvolvimento vegetal.

Referências

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 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, PR. 2006.

Chen, M.; Wang, Q-Y.; Cheng, X-G.; Xu, Z-S.; Li, L-C.; Ye, X-G.; Xia, L-Q.; Ma, Y-Z. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high- salt tolerance in transgenic plants. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 353:2, 299-305, 2007.

Farias, J. R. B.; Nepomuceno, A. L.; Neumaier, N.; Tobita, S.; Almeida, I. R. de. Restrições de disponibilidade hídrica: obtenção de elevados rendimentos de grãos de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 4., 2006, Londrina. Resumos... Londrina, PR: Embrapa Soja. p. 32-33. 2006.

Furihata, T.; Maruyama, K.; Fujita, Y.; Umezawa, T.; Yoshida, R.; Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. PNAS. 103(6): 1988-1993. 2006.

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. and Yamaguchi-Shinozaki, K. Metabolic Pathways Involved in Cold Acclimation Identified by Integrated Analysis of Metabolites and Transcripts Regulated by DREB1A and DREB2A. Plant Physiology. 150:1972–1980. 2009.

Nakashima, K.; Ito, Y. and Yamaguchi-Shinozaki, K. Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in *Arabidopsis* and Grasses. Plant Physiology. 149: 88–95. 2009.

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 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, PR. 2007.

OECD *Observer* n°278, March. 2010.

Sakuma, Y.; Maruyama, K.; Qin, F.; Osakabe, Y.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water- stress-responsive and heat-stress - responsive gene expression. Proceedings National. Academy. Science. USA 103(49):18822-18827. 2006.

Schramm, F.; Larkindale, J.; Kiehlmann, E.; Englich, G.; Vierling, E.; Pascal, von K-D. A cascade of transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response in *Arabidopsis*. The Plant Journal. 53:264-274. 2008.

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. 159 f. Tese de Doutorado. UNESP-Jaboticabal. 2007.

Stolf-Moreira, R. ; Medri, M.E. ; Neumaier, N. ; Lemos, N.G. ; Brogin, R.L.; Marcelino, F.C. ; de Oliveira, M.C.N. ; Farias, J.R.B. ; Abdelnoor, R.V. ; Marcelino, F.C.; Nepomuceno, A.L. . Cloning and quantitative expression analysis of drought-induced genes in soybean. Genetics and Molecular Research, v. 9, p. 858-867, 2010.

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.; Trethowan, 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.; Kakimoto, M.; Maruyama, K.; Osakabe, Y.; Tran, L-S.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Regulation and functional analysis of ZMDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. *The Plant Journal*. 50:54-69, 2007.

Yoshida, T.; Fujita, Y.; Sayama, H.; Kidokoro, S.; Maruyama, K.; Mizoi, J.; Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal*. 61:672–685. 2010.