

ANÁLISE FISIOLÓGICA E AGRONÔMICA DE PLANTAS DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADAS COM OS GENES *AtDREB1A* E *AtDREB2A* SOB DÉFICIT HÍDRICO EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE CAMPO

R. Fuganti-Pagliarini; 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
EMBRAPA - Soja, Rod. Carlos João Strass, Caixa Postal 231, CEP 86001-970, Londrina, Paraná, Brasil. (43) 3371-6197. rfuganti@cnpso.embrapa.br

Palavras chaves: *Glycine max*, seca, elemento responsivo a desidratação, produtividade

Introdução

As perdas de produtividade relacionadas à seca tem sido atualmente o principal desafio para a produção de grãos. As mudanças climáticas decorrentes do aquecimento do planeta têm aumentado consideravelmente os eventos de seca nas últimas décadas (Stokstad, 2004). Se consideradas as perdas em todo agronegócio, os valores associados ao déficit hídrico são bastante expressivos; na safra 04/05 as perdas diretas no sul do Brasil atingiram mais de US\$ 2,32 bilhões, no Rio Grande do Sul, por exemplo, as perdas atingiram 70% da cultura (Farias et al., 2005ab). Neste contexto, a busca de cultivares mais tolerantes à seca tem sido foco constante de pesquisadores. A Embrapa Soja juntamente JIRCAS (*Japan International Research Center for Agricultural Sciences*) 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 e Yamaguchi - Shinozaki, 2000). O uso de construções gênicas contendo promotores estresse induzidos 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 agronômicas de interesse (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar dados fisiológicos e agronômicos coletados em experimento conduzido em condições de campo no qual cultivares convencionais de soja e plantas GMs contendo as construções *AtDREB1A* e *AtDREB2A* foram submetidas à diferentes regimes hídricos.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na fazenda experimental Embrapa Soja, localizada em Londrina-PR durante a safra 2009/10. As condições de cultivo foram realizadas de acordo com recomendações da Embrapa Soja e os dados de temperatura e precipitação foram coletados na estação agrometeorológica instalada na unidade, localizada a 23°11' S, 51°11' W e 630m de altitude. 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, toda vez que ocorresse chuvas num período de 41 dias entre os estádios de desenvolvimento R₃ a R₆.

Os tratamentos nas sub-parcelas foram: Cultivares de soja convencional EMBRAPA 48, BR16, e as linhagens GMs P58 (*AtDREB1A*) e P2193 (*AtDREB2A*). As linhagens GM P58 e P2193 foram obtidas pela introdução, na cultivar convencional BR16, respectivamente das construções gênicas contendo o promotor estresse induzido *rd29A* e a região codante dos fatores de transcrição *AtDREB1A* e *AtDREB2A*, ambos isolados de *A. thaliana*. Estas linhagens foram escolhidas baseando-se em estudos anteriores que indicaram alta expressão do transgene inserido (Beneventi, 2006, Polizel, 2007, Engels, 2010). Dados de peso seco da parte aérea, altura, n° de nós, n° total de vagens, peso seco de 100 sementes, n° de vagens com sementes e produtividade foram analisados. Dados de trocas gasosas [Fotossíntese (A) e Condutância estomática (gs)], potencial hídrico e teor relativo de água (TRA) foram

coletados. Eficiência de uso de água (EUA) instantânea foi calculada por meio da razão A/g_s . Para as medidas de trocas gasosas utilizou-se um LI-6400 *Portable Photosynthesis System* (LiCor, Inc.). Medições foram obtidas do folíolo central da folha mais jovem completamente expandida sob uma densidade de fluxo de fótons de $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O Ψ_w foi determinado utilizando-se psicrômetros de termopar (modelo C-30-SF, Wescor) segundo Nepomuceno et al., 1998. As análises foram realizadas separadamente, considerando – se os dados provenientes dos abrigos e dos tratamentos irrigado e não irrigado A análise de alguns parâmetros será apresentada a seguir.

Resultados e Discussão

Quando os dados das plantas de soja que permaneceram sob os abrigos (CM) foram comparados aos dados coletados em tratamento não irrigado, observou-se que a taxa de a taxa de trocas gasosas (A e g_s), potencial hídrico foliar (Ψ) e teor relativo de água (TRA) foram reduzidos e que os diferentes genótipos de soja convencionais BR16, Embrapa 48 e GMs P58 (*AtDREB1A*) e P2193 (*AtDREB2A*) foram igualmente afetados (Figura 01) pela condição de deficiência hídrica. Segundo o critério proposto por Hsiao (1973) para que um estresse de deficiência hídrica seja considerado moderado/severo, o potencial hídrico e o TRA devem ser considerados. Baseados neste princípio considerou-se que os genótipos convencional BR16 e GM P58 (*AtDREB1A*) estiveram sob déficit hídrico severo (aproximadamente -1.8 MPa) e os genótipos Embrapa 48 e GM P2193 (*AtDREB2A*) estiveram sob estresse moderado (aproximadamente -1.5 MPa). Contudo, nenhum dos genótipos teve seu TRA reduzido em mais de 20%, outro critério que também determinaria a ocorrência de estresse severo.

Pôde-se verificar ainda que sob disponibilidade de água reduzida (nos abrigos), o fechamento estomático mesmo que parcial reduziu a condutância estomática e conduziu ao aumento da EUA instantânea neste tratamento (Figura 01). Mathur - Bhatnagar et al., (2007) trabalhando com expressão estresse induzida de *AtDREB1A* em *Arachis hypogaea* também observaram que a relação negativa entre EUA e g_s . Polizel (2007) trabalhando com *Glycine max* submetida ao déficit hídrico observou que as taxas fotossintética e de transpiração declinaram logo no início do tratamento de déficit hídrico.

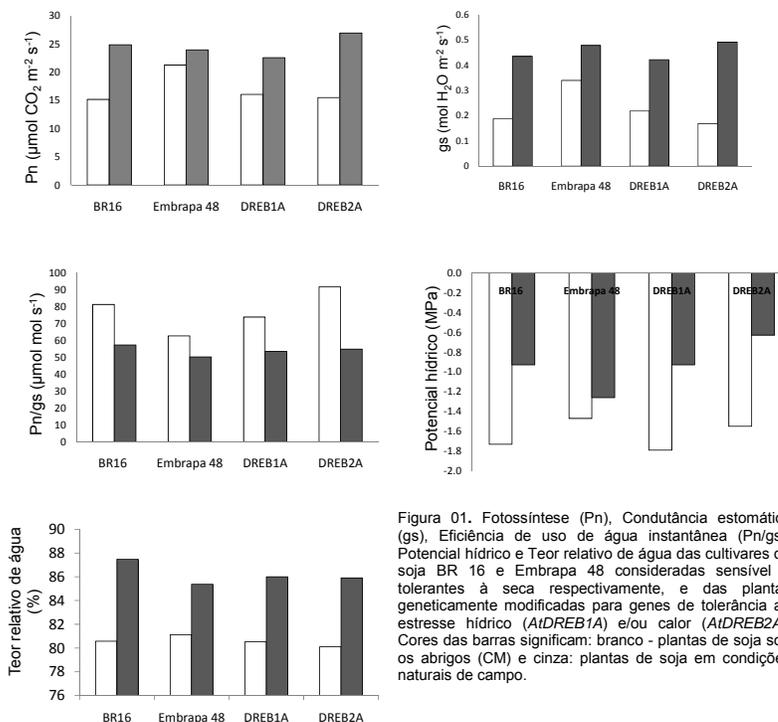
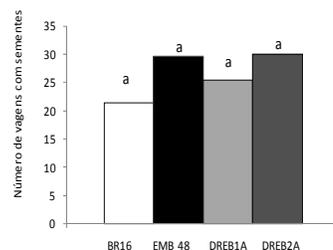
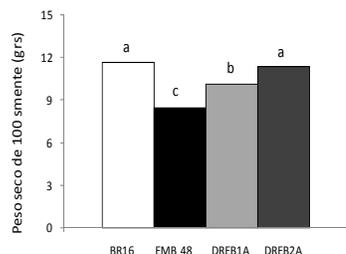
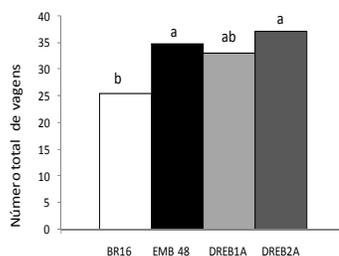
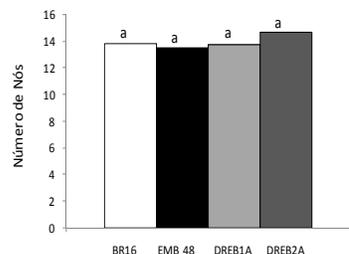
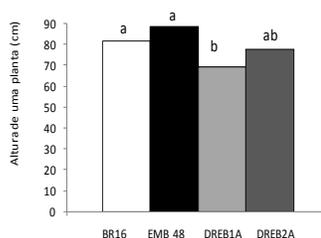
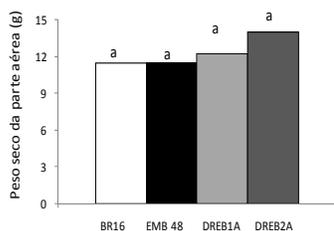


Figura 01. Fotossíntese (Pn), Condutância estomática (gs), Eficiência de uso de água instantânea (Pn/gs), Potencial hídrico e Teor relativo de água das cultivares de soja BR 16 e Embrapa 48 consideradas sensível e tolerantes à seca respectivamente, e das plantas geneticamente modificadas para genes de tolerância ao estresse hídrico (*AtDREB1A*) e/ou calor (*AtDREB2A*). Cores das barras significam: branco - plantas de soja sob os abrigos (CM) e cinza: plantas de soja em condições naturais de campo.

A ausência de diferenças entre os diferentes genótipos ocorreu também nos abrigos para componentes do crescimento (número de nós, altura da planta, peso seco da parte aérea) e componentes do rendimento (número total de vagens, número de vagens com sementes) estudados (Figura 02). Exceções ocorreram para dados de altura das plantas GM P58 (*AtDREB1A*) e BR16, os quais foram significativamente diferentes. Como não foram observadas diferenças no número de nós para nenhum dos genótipos estudados concluiu-se que plantas GM P58 (*AtDREB1A*) possuem distâncias internodais menores que a cultivar convencional BR16. Diferenças significativas foram encontradas para o peso de 100 sementes entre os genótipos BR 16 e GM P2193 (*AtDREB2A*) e Embrapa 48 e GM P58 (*AtDREB1A*)



Nos abrigos, a ausência de diferenças significativas entre os OGMs P58 (*AtDREB1A*) e P2193 (*AtDREB2A*) e as cultivares convencionais BR16 (sensível ao estresse hídrico) e Embrapa 48 (tolerante ao estresse hídrico) pode ser atribuída a não ocorrência de déficits severos durante a estação de crescimento da soja. Cabe ressaltar que a ausência de chuvas, isoladamente, não significa obrigatoriamente, ocorrência de déficit hídrico. Toda dinâmica da água no sistema solo - planta - atmosfera ocorre em função da demanda evaporativa da atmosfera (caracterizadas pela ocorrência de alta radiação, ventos, altas temperaturas e baixa umidade relativa do ar (Farias et al., 2007). O monitoramento das condições climáticas durante o experimento indicou que a precipitação pluviométrica apresentou uma distribuição regular ao longo de todo o ciclo da cultura totalizando 1050 mm (do plantio a colheita), resultando em um excesso hídrico acumulado de meados de dezembro a meados de fevereiro de 368,7 mm e ainda que, as temperaturas observadas durante o experimento foram consideradas amenas (20,3°C a 25,9°C) (Pinheiro et al., 2010), condições que dificultaram a imposição do tratamento de deficiência hídrica mesmo sob os abrigos.

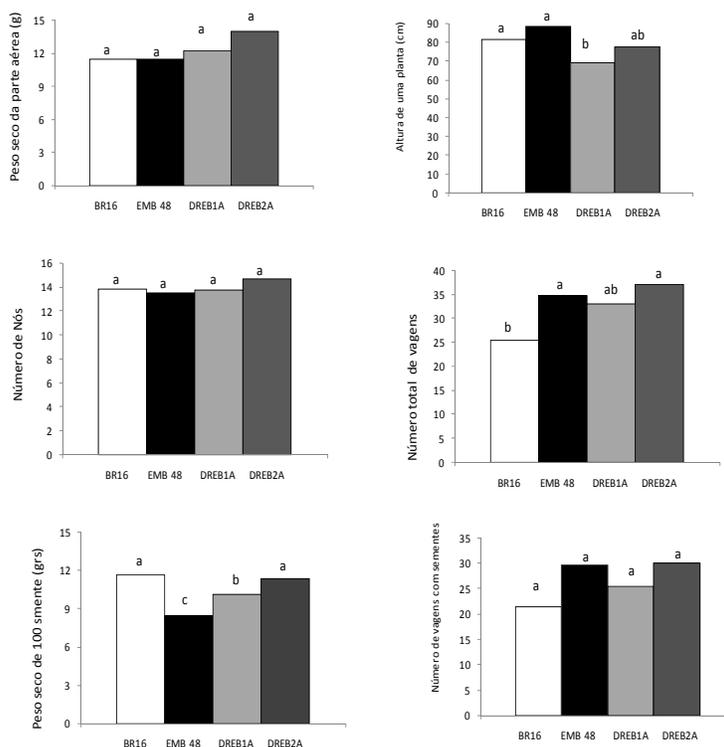


Figura 02: Peso seco da parte aérea, altura, número de nós, número total de vagens, peso seco de 100 sementes, número de vagens com sementes das cultivares de soja convencionais (BR16 e Embrapa 48) e das linhagens GMs para os genes *AtDREB1A* e *AtDREB2A* que conferem tolerância à seca e a seca e ao calor respectivamente. Dados coletados nas plantas sob abrigo.

Quando os dados obtidos dos tratamentos irrigado (dados não mostrados) e não irrigado foram comparados e analisados separadamente do restante do experimento, os resultados mostraram que as cultivares convencionais e GMs apresentaram a mesma produtividade (Figura 03C). No entanto, quando alguns dos componentes de produtividade foram analisados individualmente, observou-se que as plantas GMs P58 (*AtDREB1A*) e P2193 (*AtDREB2A*) apresentaram maior número total de vagens quando comparadas à BR16 e semelhante a cultivar convencional Embrapa 48 (Figura 03A).

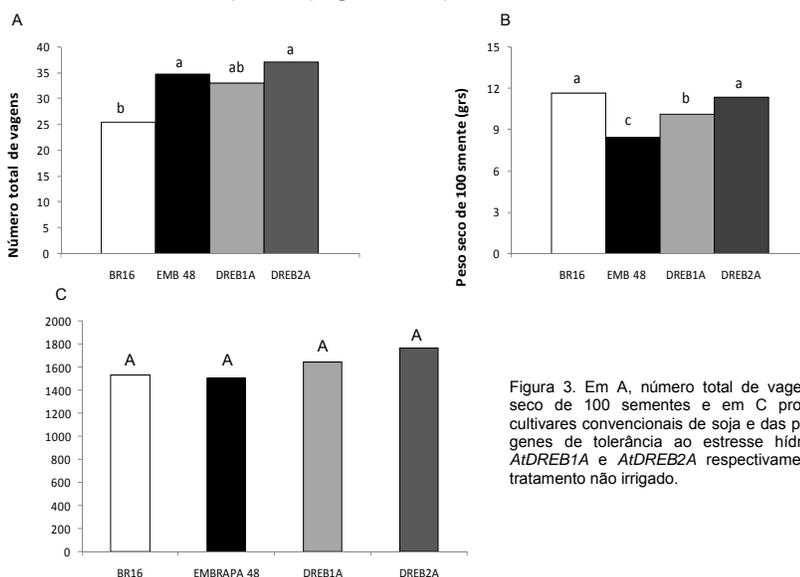


Figura 3. Em A, número total de vagens, em B, peso seco de 100 sementes e em C produtividade das cultivares convencionais de soja e das plantas GM para genes de tolerância ao estresse hídrico e/ou calor *AtDREB1A* e *AtDREB2A* respectivamente. Dados do tratamento não irrigado.

Esses dados podem indicar que nas linhagens GMs P58 (*AtDREB1A*) e P2193 (*AtDREB2A*) e na cultivar convencional Embrapa 48 ocorreu menor abortamento de vagens, resultado de menor abortamento de flores. Na cultura da soja, déficit hídrico causa queda prematura de folhas e flores e abortamento de vagens, resultando em redução de rendimento de grãos, portanto, genótipos com menor abortamento de flores/vagens são considerados promissores, em de condições de déficit hídrico quando comparadas com cultivares que abortam muitas flores e reduzem produtividade final. A ausência de diferença significativa no parâmetro produtividade indica que embora considerada suscetível à seca, a cultivar convencional BR16 compensou o abortamento de flores/vagens com enchimento de grãos maiores, na condição de disponibilidade de água no solo (Figura 3B).

Conclusões

Observou-se por meio das taxa de trocas, EUA, potencial hídrico foliar (Ψ) e TRA que as plantas de soja mantidas sob os abrigos móveis sofreram estresse e que os diferentes genótipos convencionais BR16, Embrapa 48, e GMs P58 (GM *AtDREB1A*) e P2193 (GM *AtDREB2A*) foram igualmente afetados. A ausência de diferenças nos parâmetros analisados foi atribuída a uma distribuição regular e excessiva de chuvas ao longo do ciclo da cultura fazendo com que não ocorressem dentro do abrigo, condições atmosféricas de baixa umidade relativa e altas temperaturas necessárias para a simulação de estresse hídrico severo. Ao comparar as plantas GMs, P58 (GM *AtDREB1A*) e P2193 (GM *AtDREB2A*) com cultivares convencionais (BR16 e Embrapa 48) em termos de produtividade nas condições irrigado (dados não mostrados) e não irrigado, observou-se que não existiram diferenças significativas, no entanto, dados dos componentes individuais de produtividade indicam que nas linhagens GMs algum mecanismo que diminuiu o abortamento de flores/vagens pode ter sido ativado e que a cultivar BR16 compensou o abortamento de flores/vagens produzindo grãos maiores e mais pesados em condições de disponibilidade de água no solo. Trabalhos futuros e a repetição deste experimento em outras safras serão realizados visando comprovar o potencial das GMs na tolerância ao estresse hídrico.

Agradecimentos

À EMBRAPA-SOJA pelos laboratórios e instalações, a CAPES e ao CNPq pelas bolsas de estudos dos estudantes envolvidos no trabalho.

Referências bibliográficas

- BENEVENTI, M.A. 2006 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..
- ENGELS, C. 2010. Obtenção e caracterização de plantas de soja geneticamente modificadas com o gene *AtDREB2A* visando tolerância à seca. 125 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina.
- FARIAS, J.R.B.; NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N.; MARION, E. 2005^a. 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.
- FARIAS, J.R.B.; NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A.L.; MARIN, F. 2005^b. Modelagem para estimativa de perdas de rendimento de grãos de soja em função da disponibilidade hídrica. In: Simpósio Internacional de Agricultura de Precisão, 3. Sete Lagoas, 2005. Artigos. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, CD-rom.
- FARIAS, J.R.B.; NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO. 2007. Ecofisiologia da Soja. Circular Técnica 48.
- HSIAO, T.e. 1973. Plant responses to water stress, Ann. Rev. Plant Physiol., New York, v.24, p.519-570.
- MATHUR-BHATNAGAR, P.; DEVI, M.J.; REDDY, D.S.; LAVANYA, M.; VADEZ, V.; SERRAJ, R.; SHINOZAKI, K., Y. SHARMA, K.K. 2007. Stress-inducible expression of *At DREB1A* in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) increases transpiration efficiency under water-limiting conditions. Plant Cell Report, v.26, p.2071-2082.

- NEPOMUCENO, A.L.; OOSTERHUIS, D.M. and STEWART, J.M. 1998. Physiological responses of cotton leaves and roots to water deficit induced by polyethylene glycol. *Environmental and Experimental Botany*, v.40, p.29-41.
- PINHEIRO, B.C.; FARIAS, J.R.B.; TONON, B.C.; SIBALDELI, R.N.R; CAMARGO, L.M.; GIANELLI, F.M. 2010. Análise da disponibilidade hídrica para a cultura da soja nas safras 2004/2005 e 2009/2010 em Londrina, PR. Resumos da V Jornada Acadêmica da Embrapa Soja. ISSN 2176-2937.
- POLIZEL, A. M. 2007. 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 (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*. 3:217-223.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance *Journal of Experimental Botany*, 58(2):221-227.
- STOKSTAD, E. 2004. States sue over global warming. *Science*, 305:590.