

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

CARACTERIZAÇÃO DE GENES CODIFICANTES DE PROTEÍNAS ASR  
(*ABA, STRESS AND RIPENING*) DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill] COM POTENCIAL  
PARA CONFERIR MENOR SUSCETIBILIDADE AO DÉFICIT HÍDRICO

LAURO BÜCKER NETO

Porto Alegre

2010

LAURO BÜCKER NETO

CARACTERIZAÇÃO DE GENES CODIFICANTES DE PROTEÍNAS ASR  
(*ABA*, *STRESS AND RIPENING*) DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill] COM POTENCIAL  
PARA CONFERIR MENOR SUSCETIBILIDADE AO DÉFICIT HÍDRICO

Dissertação de mestrado para obtenção do  
título de mestre no Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Biologia Molecular  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientadora: Maria Helena Bodanese Zanettini  
Co-orientadora: Luciane Maria Pereira Passaglia

Porto Alegre

2010

LAURO BÜCKER NETO

CARACTERIZAÇÃO DE GENES CODIFICANTES DE PROTEÍNAS ASR  
(*ABA*, *STRESS AND RIPENING*) DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill] COM POTENCIAL  
PARA CONFERIR MENOR SUSCETIBILIDADE AO DÉFICIT HÍDRICO

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul como requisito  
para obtenção do título de mestre em Genética  
e Biologia Molecular

Março de 2010

Banca Examinadora

---

Componente da Banca Examinadora - Instituição a que pertence

---

Componente da Banca Examinadora - Instituição a que pertence

---

Componente da Banca Examinadora - Instituição a que pertence

Aos meus pais e avós, dedico esta conquista com gratidão.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a ajuda fundamental de minhas orientadoras, Maria Helena e Luciane, pela receptividade no acolhimento de minhas dúvidas, bem como pela dedicação e paciência no transcorrer desta caminhada. Também cabe ressaltar a relevância dos conselhos e ensinamentos da professora Márcia Margis em minha formação.

Agradeço aos meus estimados Alexandro, Felipe, Gustavo, João, Júlio, Marcelo, Rafas (Arenhart, Rodrigues de Oliveira, Rauber), René e Roberto pelo fervor de sua criatividade cultural e grande desenvoltura no ramo do entretenimento.

Com relação ao sexo oposto, ressalto a simpatia e educação com que avaliaram meus desvios de conduta ao longo deste período.

Em se tratando deste gênero, agradeço a Beatriz Wiebke Strohm, com quem aprendi a lidar com dilemas pessoais no que tange aos entraves técnicos enfrentados no cotidiano de todo aquele que almeja compreender um pouco mais sobre algumas realidades.

Ademais, menciono o auxílio fundamental de Ana Paula Trivilin, Leonardo Bitencourt Scoz, Rafael Augusto Arenhart e Rafael Rodrigues de Oliveira, pela paciência e auxílio nos percalços de nossos estudos, assim como sua disponibilidade quando da realização das imbricadas técnicas de análise molecular e cultivo de *Arabidopsis thaliana*.

## RESUMO

Um grande empecilho para a manutenção e estabilidade da produção nacional de soja reside na suscetibilidade dos diferentes genótipos aos estresses ambientais. Tendo em vista a importância social e econômica da leguminosa e os efeitos extremamente danosos dos estresses abióticos sobre a agricultura, faz-se necessário maior conhecimento acerca das interações entre os estímulos estressores e as respostas da planta. A seca é considerada o principal fator limitante na produtividade agrícola. Sendo assim, a identificação e caracterização de genes responsivos a essa condição é um passo inicial na compreensão das respostas adaptativas ao déficit hídrico. Os genes *Asr* (*ABA, Stress and Ripening*) são induzidos por estresse e ácido abscísico (ABA) e seus níveis de expressão são rapidamente aumentados em resposta à salinidade e seca. Nesse estudo os genes da família *Asr* de soja foram clonados. Estas proteínas são hidrofílicas e ricas nos aminoácidos Ala, His, Glu e Lis, apresentando homologia com ASRs de outras plantas, como atestado nas análises de múltiplos alinhamentos. O perfil de expressão foi avaliado através de RT-qPCR em tempo real e revelou que *Asr1* tem um distinto padrão de indução no nível de transcritos em folha sob tratamento com ABA, sal e seca, enquanto *Asr3* apresenta padrão distinto de indução na expressão em raiz, sob tratamento com ABA e seca. Além disto, foram construídos vetores para a superexpressão e localização subcelular das proteínas ASR1, ASR2 e ASR3 em plantas. Plantas de *Arabidopsis thaliana* foram submetidas a um protocolo de transformação genética mediada por *Agrobacterium*.

**Palavras-chave:** família ASR – estresse abiótico – perfil de expressão – *Glycine max*

## ABSTRACT

One of the major obstacles to maintain the stability of the national production of soybean (*Glycine max*) lies on the susceptibility of different genotypes to abiotic stress. In view of the social and economic importance of soybean and due to the extremely harmful effects of stress in agriculture, detailed knowledge of the interaction between these stresses and plant response to environmental stimuli is necessary. Drought is considered the main abiotic limitation factor for agricultural productivity. Identification and characterization of responsive genes to this condition is an initial step in understanding the adaptive responses to drought. The *Asr* (**A**BA, **S**tress and **R**ipening) genes are induced by stress and abscisic acid (ABA) in plants, and their expression levels are quickly increased in response to salinity and drought. In this study *Asr* genes from *Glycine max* were cloned. These proteins were found to be hydrophilic and rich in amino acids Ala, His, Glu and Lys, showing homology with those of other plant *Asr* genes via multiple alignment analysis. RT-qPCR analyses revealed that *Asr1* had a distinct up-regulated transcript pattern in leaf under ABA, NaCl and drought treatments, while *Asr3* had a distinct up-regulated transcript pattern in root under ABA and drought treatments. Besides, vectors for ASR1, ASR2 and ASR3 proteins overexpression and subcellular localization in plants were constructed. *Arabidopsis thaliana* plants were submitted to an *Agrobacterium*-mediated transformation procedure.

**Keywords:** ASR family - abiotic stress - profile expression - *Glycine max*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1 SOJA: UMA LEGUMINOSA DE GRANDE RELEVÂNCIA ECONÔMICA .....	13
1.2 ÁCIDO ABCSÍCICO: O FITORMÔNIO UNIVERSAL DO ESTRESSE .....	16
1.3 ESTRESSE SALINO .....	20
1.4 SECA .....	23
1.5 GENES <i>ASR</i> ( <i>ABA</i> , <i>STRESS AND RIPENING</i> ) .....	29
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
3.1 IDENTIFICAÇÃO DA FAMÍLIA <i>ASR</i> DE SOJA, CONSTRUÇÃO DE <i>PRIMERS</i> (OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES) E ANÁLISES COMPARATIVAS ENTRE SEQUÊNCIAS .....	34
3.2 PROCEDIMENTO PARA AVALIAR O PERFIL DE EXPRESSÃO DA FAMÍLIA <i>ASR</i> NOS EXPERIMENTOS COM ÁCIDO ABCSÍCICO ( <i>ABA</i> ) E SAL ( <i>NaCl</i> ).....	34
<b>3.2.1 Tratamento com ácido abscísico (<i>ABA</i>) .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.2 Tratamento com sal (<i>NaCl</i> 75 e 150 mM) .....</b>	<b>35</b>
3.3 TRATAMENTO COM SECA .....	36
3.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL .....	36
3.5 SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA).....	37
3.6 AMPLIFICAÇÃO DOS MEMBROS DA FAMÍLIA <i>ASR</i> DE SOJA UTILIZANDO A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	38
3.8 RT-qPCR EM TEMPO REAL .....	39
3.9 CLONAGEM NO VETOR DE ENTRADA PENTR .....	41
3.10 TRANSFORMAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> (LINHAGEM TOP10) POR ELETROPORAÇÃO .....	42
3.11 CLONAGEM NO VETOR BINÁRIO PH7FWG2 PARA ESTUDOS DE LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR E NO VETOR BINÁRIO PH7WG2D PARA ESTUDOS DE SUPEREXPRESSION.....	43
3.12 TRANSFORMAÇÃO DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> (LINHAGEM LBA4404).....	45
3.13 TRANSFORMAÇÃO DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	45
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>



4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS ASR DE SOJA .....	47
4.2 PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES <i>ASR</i> DE SOJA .....	53
<b>4.2.1 Análise da Expressão de Genes <i>Asr</i> em Resposta ao Fitormônio ABA .....</b>	<b>54</b>
<b>4.2.2 Análise da Expressão de Genes <i>Asr</i> em Resposta a Sal .....</b>	<b>56</b>
<b>4.2.3 Análise da Expressão de Genes <i>Asr</i> em Resposta ao Déficit Hídrico .....</b>	<b>58</b>
4.3 OBTENÇÃO DOS VETORES DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS PARA O ESTUDO DA SUPEREXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DAS PROTEÍNAS ASR DE SOJA.....	62
4.4 TRANSFORMAÇÃO DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	64
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
5.1 ANÁLISES <i>IN SILICO</i> .....	66
5.2 EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES <i>ASR</i> DE SOJA .....	69
5.3 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR E SUPEREXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ASR DE SOJA .....	72
<b>6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>74</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>86</b>
ANEXO 1 .....	86
ANEXO 2 .....	88
ANEXO 3 .....	89

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas são organismos sésseis que frequentemente enfrentam situações ambientais estressoras, tendo de suplantar adversidades decorrentes da ação de metais pesados, ferimentos, seca, alta salinidade, alterações na temperatura e luz, bem como ataques de patógenos e pestes (BAJGUZ e HAYAT, 2008).

Em resposta à miríade de elementos estressores, vastas alterações moleculares, fisiológicas e anatômicas ocorrem nos vegetais, sendo os fatores abióticos responsáveis pela imposição de severas restrições ao desenvolvimento e, uma vez que são elementos constituintes do ambiente nativo das plantas, conduzem a drásticas reduções da biomassa e da produtividade na colheita de grãos, ameaçando a sustentabilidade da agricultura (MAHAJAN e TUTEJA, 2006). De acordo com Cakman (2002) a sensibilidade das colheitas à severidade climática e às condições do solo caracteriza-se como principal limitação para a produção de comida em nível mundial.

Como resposta a fatores externos detrimenais, o processo evolutivo das plantas permitiu desenvolver sofisticados mecanismos de percepção a condições desfavoráveis, através da ativação de cascatas de transdução de sinais, as quais ativam genes de resposta ao estresse e culminam em modificações fisiológicas e bioquímicas, cujo objetivo é galgar empecilhos vigentes (GAO et al, 1997). Sendo assim, foram selecionadas variadas adaptações genéticas, bioquímicas e fisiológicas com o escopo de sobrepujar as limitações impostas por estes fatores abióticos (MITRA, 2001; ZHU et al. 2002). Tais adaptações envolvem várias mudanças na maquinaria celular, possibilitando o surgimento de novas rotas metabólicas, acúmulo de metabólitos de baixo peso molecular, síntese de proteínas especiais, mecanismos de detoxificação e mudanças nos níveis de fitormônios (BAJGUZ e HAYAT; 2008). Uma estratégia muito interessante adotada por genótipos tolerantes de diversas espécies, é

umentar sua taxa de crescimento para compensar a redução nas durações fenológicas, o que permite à planta evitar fases de crescimento críticas sob condições desfavoráveis.

Para tanto, o desenvolvimento vegetal, o metabolismo e as respostas ao estresse, assim como variadas funções, dependem da correta regulação da expressão gênica, processo mediado por múltiplos mecanismos, sendo talvez, o controle mais importante exercido ao nível da transcrição (ZUNKAR, 2007). É no estudo desta complexa rede de relações que se percebe a seca, a salinidade, as extremas temperaturas e o estresse oxidativo como elementos geralmente interconectados e com potencial para indução de danos celulares similares. Por exemplo, a seca e/ou a salinidade são primeiramente manifestadas como estresse osmótico, resultando na quebra da homeostase e distribuição dos íons nas células. O estresse oxidativo, o qual frequentemente acompanha alta temperatura, salinidade ou estresse por seca, pode causar a desnaturação de proteínas funcionais e estruturais. Como consequência, estes diversos estresses ambientais geralmente ativam rotas de sinalização celular e resposta celular similares, como a produção de proteínas específicas, aumento na regulação de antioxidantes e acúmulo de solutos compatíveis (BAJGUZ e HAYAT, 2008). Ademais, recentemente tem sido demonstrado que os miRNAs de plantas estão envolvidos em várias respostas a estresses abióticos, constituindo-se em importantes reguladores destes processos, com predições e confirmações experimentais corroborando com seu papel de fundamental relevância (LU e HUANG, 2008).

Uma maior compreensão da complexa rede regulatória dos sinais que permitem as plantas responderem aos desafios do meio ambiente também tem emergido com o estudo de fatores de transcrição. Geralmente, vários fatores de transcrição relacionados possuem potencial para ativar ou reprimir genes por meio de sequências *cis* que respondem a estresses específicos. Esses fatores possuem sobreposição de funções o que tem dificultado as análises genéticas de seus respectivos papéis, uma vez que mutantes geralmente não apresentam um

fenótipo distinto. Não obstante as dificuldades existentes começam a emergir evidências de possíveis redes de mediação a percepção do estresse (SINGH et al., 2002).

Porém, os esforços direcionados à elucidação dos imbricados mecanismos moleculares envolvidos no processo de resposta ao estresse, a intrincada rede de respostas gênicas que permeia a percepção, o reconhecimento do sinal e a ativação dos genes de resposta final permanecem pouco conhecidos (KACPERSKA, 2004).

## 1.1 SOJA: UMA LEGUMINOSA DE GRANDE RELEVÂNCIA ECONÔMICA

As leguminosas constituem elemento importante no cenário agronômico mundial, uma vez que atuam como fixadoras do nitrogênio atmosférico em virtude da íntima simbiose com microrganismos. A soja cultivada [*Glycine max* (L.) Merrill], em particular, possui destaque como principal fonte de proteína e óleo vegetal, tanto para a alimentação humana como animal. É, também, a primeira espécie, dentre as leguminosas, com a sequência genômica completa (SCHMUTZ et al., 2010). Friedman e Brandon (2001) registram os benefícios à saúde na utilização dos produtos a base de soja, incluindo efeitos como redução do colesterol, prevenção do câncer, diabetes e obesidade, assim como proteção contra doenças do intestino e rins. Ademais, recentemente a leguminosa está sendo vista como uma cultura atrativa para a produção de biodiesel (PIMENTEL e PATZEK, 2005).

Segundo dados da USDA [apud EMBRAPA (2010)], cerca de 96,3 milhões de hectares de soja foram cultivados na safra 2008/2009 ao redor do mundo, chegando a uma produção de 210,6 milhões de toneladas. O Brasil ocupa o posto de segundo maior produtor mundial de soja. Nessa mesma safra, a cultura ocupou uma área de 21,7 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 57,1 milhões de toneladas.

No Rio Grande do Sul, as culturas de soja, milho e arroz constituem a base da agricultura, setor econômico majoritário do Estado (IBGE/FEE apud SECRETARIA ESTADUAL DA AGRICULTURA, PECUÁRIA, PESCA E AGRONEGÓCIO, 2002). Episódios de seca recorrente evidenciam a necessidade do cultivo de variedades menos sensíveis às condições climáticas da região, fato este que minimizará as perdas significativas da produtividade destes grãos. De acordo com Mahajan e Tuteja (2006) são os estresses abióticos que causam a perda de milhões de dólares a cada ano devido à queda de rendimento nas safras.

O grande interesse econômico da soja a torna um importante alvo para o melhoramento genético. No entanto, a base genética das cultivares brasileiras é bastante estreita, uma vez que a maioria dos genótipos disponíveis para o cultivo é oriunda de ancestrais comuns (HIROMOTO e VELLO, 1986; ABDELNOOR et al.,1995). Além disso, a fonte dos recursos genéticos representada por espécies afins é inacessível para a soja, devido à incompatibilidade sexual dos cruzamentos interespecíficos e intergenéricos (HU e BODANESE-ZANETTINI, 1995; BODANESE-ZANETTINI et al., 1996; PRIOLLI et al., 2002). Em decorrência disto, programas convencionais de melhoramento são submetidos a restrições acentuadas, resultando em progressos genéticos pouco significativos. Tais dificuldades para o melhoramento são intensificadas pelo clima semitropical do Brasil; a soja cultivada que foi introduzida no Brasil é originária de países com clima temperado.

Neste contexto, a genômica funcional e a engenharia genética abrem novas possibilidades para o melhoramento da soja. O emprego destas abordagens possibilitará a identificação de novos genes e a determinação de seus padrões de expressão em resposta a variados estresses, possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias no que tange a melhora de características de interesse agrônomo. A transformação genética abre a perspectiva de produção de genótipos com maior produtividade e menor suscetibilidade aos diferentes estresses ambientais, o que possivelmente poderá reduzir custos e acarretar em uma maior estabilidade à produção agrícola.

Os conhecimentos oriundos de estudos com o genoma de plantas modelo alavancaram importantes descobertas sobre o funcionamento de genes envolvidos em várias funções fisiológicas das células. Atualmente, algumas construções gênicas ou estratégias de construção já estão patenteadas e genes-chave de rotas de resposta a estresses bióticos e abióticos são utilizados na produção de plantas transgênicas. Neste contexto, estudos genômicos, transcritômicos e proteômicos, bem como a aplicação de modernas ferramentas

biotecnológicas de transferência de genes, suscitam a possibilidade de suplantar entraves impostos por condições ambientais adversas. Desta forma, dispõe-se de uma alternativa efetiva que visa minimizar a susceptibilidade da soja a limitações abióticas.

Atualmente, uma abordagem muito empregada na transformação genética consiste na utilização de fatores de transcrição ou elementos envolvidos nas vias de sinalização celular, os quais promoverão alterações na percepção, sinalização do estímulo e no controle transcricional. Estas novas abordagens têm permitido ampliar as possibilidades de melhoramento genético de variadas espécies vegetais com interesse agrônômico, uma vez que diversos genes superexpressos em plantas transgênicas apresentam melhora significativa na tolerância a diferentes estresses (BARTELS e SUNKAR, 2005).

Nesta conjuntura, em 2008, foi formado o Consórcio Nacional para Estudo do Genoma da Soja (GENOSOJA-CNPq). O projeto propôs a união dos esforços, que vinham sendo conduzidos individualmente por diferentes grupos de pesquisa no Brasil, e a formação de um Consórcio Nacional que se agregará ao Consórcio Internacional de Sequenciamento do Genoma da Soja (*The International Soybean Genome Consortium - ISGC*). A perspectiva é que a integração das informações geradas no projeto, nos diferentes níveis (estrutural, transcricional, proteico e funcional), através de ferramentas de bioinformática, auxiliará na compreensão da função e dos mecanismos de controle da expressão de genes presentes na soja e envolvidos em diferentes processos de desenvolvimento e/ou defesa contra estresses ambientais (bióticos e abióticos). Almeja-se que estes resultados sejam empregados em programas de melhoramento, com vistas a atenuar os efeitos de estresses como seca, doenças e pragas, que comprometem a cultura da referida leguminosa.

## 1.2 ÁCIDO ABCÍSIKO: O FITORMÔNIO UNIVERSAL DO ESTRESSE

Para suplantar as variações ambientais circundantes, as plantas utilizam uma complexa família de hormônios com vista a regular seu crescimento e reprodução. O ácido abscísico (ABA) é um hormônio vegetal que coordena resposta a fatores estressores, tais como seca, extrema temperatura e alta salinidade, assim como regula respostas fisiológicas relacionadas à maturação da semente e à dormência das gemas (SHEARD e ZHENG, 2009).

O ABA é um sesquiterpeno (C<sub>15</sub>) cuja biossíntese em plantas ocorre via uma rota indireta, na qual são utilizados precursores de carotenoides. Inicialmente, as reações, nos precursores diretos, ocorrem nos plastídeos e culminam com a oxidação do aldeído abscísico, no citoplasma, produzindo, por fim, ABA (NORTH et al, 2007).

O papel do ABA como fitohormônio universal do estresse está consagrado e sua principal função parece ser a regulação do balanço de água e a tolerância ao estresse osmótico (MAHAJAN e TUTEJA, 2005), muito embora sua ação na defesa a patógenos também deva ser mencionada (ASSELBERGH et al., 2008). Sob condições adversas, quando do início da escassez de água no solo e quando o potencial hídrico nas folhas ainda não foi afetado, o referido hormônio vegetal acumula nos tecidos radiculares. Posteriormente, ele é liberado para os vasos do xilema e transportado para a parte aérea do vegetal, onde as atividades dos estômatos e meristemas são reguladas, com o escopo de auxiliar a planta a suplantar as potencialmente perniciosas condições ambientais (JIANG e HARTUNG, 2007).

Segundo Shinozaki e Yamagushi-Shinozaki (2000) resultados experimentais demonstraram que respostas moleculares a variados estresses ambientais são mediadas por complexos sistemas regulatórios de expressão gênica e transdução de sinal, e por uma resposta cruzada entre tais sistemas. Desta forma, como muitos estresses abióticos findam na dessecação da célula e no desbalanço osmótico, há uma sobreposição no perfil de expressão



de genes responsivos a estresse após situações de frio, seca, alta salinidade e aplicação de ABA. Sendo assim, se sugere que vários destes sinais estressores e ABA compartilhem elementos em comum em suas rotas de sinalização e que estes elementos estejam interconectados, com vistas a manter a homeostase celular (MAHAJAN e TUTEJA, 2005). Ainda, de acordo com Ishitani e colaboradores (1997) mesmo as rotas de transdução de sinal ABA-dependente e ABA-independente, inicialmente propostas como atuando de maneira paralela na mediação da expressão gênica em resposta a frio e estresse osmótico, na realidade interagem e convergem para ativar a expressão de genes que conduzirão a adaptações fisiológicas e morfológicas na planta.

No passado, o papel desempenhado pelo fitormônio foi analisado através do monitoramento dos efeitos da aplicação do próprio ABA ou de inibidores da biossíntese de carotenóides. Os resultados obtidos possibilitaram relacionar mudanças no conteúdo do ácido abscísico com alterações fisiológicas e no desenvolvimento. Não obstante, as aplicações exógenas de compostos químicos, com o objetivo de modificar os níveis endógenos de ABA, apresentavam uma série de complicações relacionadas à dosagem, rápido metabolismo e efeito de inibidores em rotas não relacionadas. Neste contexto, o uso de mutantes na biossíntese ou ação de ABA tem sido uma alternativa efetiva para elucidar pormenores relacionados, tornando-se uma ferramenta essencial para estes estudos (KOORNNEEF et al., 1998). Como se espera que mutantes com perturbações na biossíntese de ABA ou nos passos iniciais do sinal de transdução do hormônio sejam afetados em todo processo, o fenótipo de mutantes ABA-deficientes fornece a melhor indicação dos processos afetados por este composto.

Em *Arabidopsis thaliana*, um grande número de mutantes tem sido isolado. Entretanto, mutantes deficientes em ABA, especialmente aqueles afetados na biossíntese do composto, também estão disponíveis em outras espécies incluindo *Nicotiana plumbaginifolia*,

*Zea mays*, *Lycopersicon esculentum* e *Pisum sativum*. A similaridade existente entre os fenótipos das referidas plantas são uma forte indicação que os efeitos do fitôrmônio são similares na maioria das espécies vegetais, permitindo a extrapolação dos resultados obtidos em estudos com a planta modelo. (KOORNNEEF et al., 1998). De acordo com Hoth e colaboradores (2002) foi a análise dos mutantes de ABA que possibilitou identificar alguns componentes desta rede de sinalização, muito embora mecanismos fundamentais ainda precisem ser elucidados.

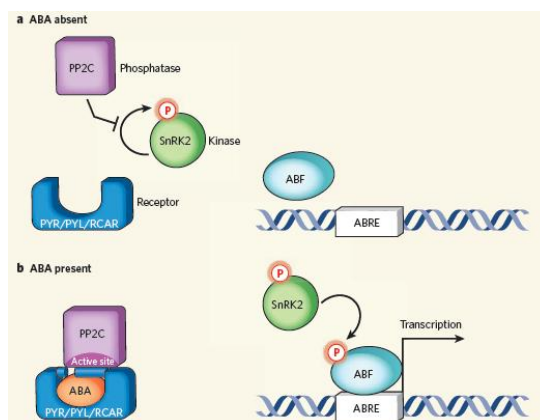
Três classes de mutantes relacionados com o ABA foram caracterizadas e suas peculiaridades denotam a influência dos diferentes componentes regulatórios na diversidade e complexidade da rede subjacente às respostas fisiológicas a ABA e a potencial resposta cruzada com outras rotas de sinalização. Em mutantes ABA-deficientes, o fechamento estomatal induzido por ABA e a expressão de alguns genes são prejudicados, conduzindo a um fenótipo característico (TAYLOR et al., 2000; XIONG et al., 2001a; XIONG et al., 2002). Alguns mutantes ABA-hipersensíveis de *Arabidopsis thaliana* exibem reduzidas taxas de germinação em baixas concentrações de ABA e reduzida perda de água devido ao aumento do fechamento estomatal induzido pelo fitormônio (LU e FEDOROFD, 2000; STEBER e MCCOURT, 2001). Por fim, mutantes ABA-insensível são afetados na inibição da germinação e crescimento mediados por ABA, e também são prejudicados no movimento estomatal (LEUNG e GIRAUDAT, 1998; WANG et al., 2001).

De acordo com McCourt e Creelman (2007) o estudo da sinalização dos hormônios em plantas sempre foi desafiador, uma vez que estas pequenas moléculas orgânicas, à primeira vista, parecem exercer as mais variadas funções. Sendo assim, a pesquisa destes compostos ao nível mecanístico, deve-se atentar na compreensão da maneira com que são percebidas e como as alterações em suas concentrações são transduzidas em uma resposta celular, o que constitui uma tarefa por demais complexa.

Não obstante os percalços entrepostos, durante a última década, principalmente através dos estudos realizados em *Arabidopsis thaliana* e *Oriza sativa* (arroz), os receptores para cada um dos cinco principais hormônios vegetais (auxina, giberilina, citocinina, etileno e ácido abscísico) foram gradualmente revelados, sendo o receptor do ácido abscísico o mais difícil de identificar, apesar de falsas reivindicações (SUSSMAN e PHILLIPS JR., 2009).

Desde 2006, várias proteínas têm sido sugeridas como possíveis receptores de ABA, mas seu exato papel na sinalização deste fitormônio permaneceu controverso (SHEARD & ZHENG, 2009). A situação melhorou com a publicação de dois estudos recentes (MA et al., 2009; PARK et al., 2009) indicando que receptores para ABA são um grupo de pequenas proteínas solúveis referidas como *Pyrabactin Resistance 1* (PYR1), *PYR-like* (PYL) e *Regulatory Components of ABA Receptor* (RCAR).

Trabalhos demonstraram que na ausência de ABA a enzima fosfatase 2C (PP2C) está livre para inibir a autofosforilação da família de SnRK2. Neste contexto, PP2C atua como um regulador negativo constitutivo desta família. Porém, na presença de ABA, a família de proteínas receptoras PYR/PYL/RCAR liga-se e sequestra PP2C. Este processo mitiga a inibição da cinase SnRK2, a qual autoativa-se e pode, subsequentemente, fosforilar e ativar fatores de transcrição a jusante (ABF - *ABA-responsive element binding factor*), os quais possibilitarão iniciar a transcrição em elementos promotores responsivos a ABA (ABREs - *ABA-responsive elements*) (SHEARD e ZHENG, 2009). A Figura 1 exemplifica o mecanismo proposto pelos autores.



**Figura 1.** Mecanismo de ativação dos genes responsivos a ABA, de acordo com Sheard e Zheng (2009)

De fato, a gama de pesquisas realizadas demonstra que os receptores de ABA exibem uma diversidade não conhecida em qualquer outro fitormônio. Na conjuntura em questão, estudos futuros permitirão determinar se uma união combinada de diferentes complexos de receptor estabelece o mecanismo para ajustar a sensibilidade na percepção de ABA, no que tange a um ótimo na troca de gás e desempenho, tornando o arcabouço de conhecimento referente ao mecanismo de funcionamento do hormônio vegetal muito mais consistente (MA et al., 2009).

### 1.3 ESTRESSE SALINO

Flowers (2003) descreve o planeta Terra como sendo salgado, em virtude da maioria da água conter aproximadamente 30 gramas de cloreto de sódio por litro. Esta solução salgada tem afetado, e continua a afetar, as terras onde plantas com interesse agrônomico são cultivadas. Muito embora a quantidade de sal presente nas zonas de plantio seja imprecisamente conhecida, os dados são suficientes para determinar que ela constitua séria ameaça à agricultura, pois somente plantas halófitas são capazes de crescer em condições onde a concentração do cloreto de sódio (NaCl) seja maior que 400 mM.

As altas concentrações de NaCl conduzem a um baixo potencial de água no meio ambiente, o qual, conseqüentemente, causa o estresse osmótico em plantas. Esta sequência de eventos ativa uma série de respostas que visam enfrentar a chamada “seca fisiológica”. (PHANG et al., 2008). De acordo com Xiong e Zhu (2001b), nas plantas “superiores” o sal é percebido por receptores específicos que iniciam uma cascata de sinalização para transmitir o sinal intracelularmente, conduzindo a ativação/produção de fatores de transcrição que alteram a expressão de um grupo específico de genes responsivos a sal. Sugere-se que receptores como proteína cinases, histidina cinases de dois componentes e receptores acoplados às proteínas G devem ser os sensores potenciais do estresse por sal.

Sendo elemento altamente prejudicial, o estresse salino é um dos fatores abióticos que reduz significativamente o rendimento nas plantações. Enquanto Lauchli (1984) [apud Pantalone et al. (1997)] indica que a soja seja uma cultura geralmente sensível à salinidade, Ashraf e colaboradores (1994) [apud Phang et al. (2008)] a classificam como uma cultura moderadamente tolerante ao estresse salino. Apesar de divergências, é consenso que o crescimento das plantas sob tais condições desfavoráveis impõe severos danos durante o ciclo de vida do vegetal.

A qualidade das sementes de soja, produto agrônômico primário, também é afetada pelo estresse salino, sendo o conteúdo de proteínas severamente prejudicado sob esta condição adversa. Por outro lado, parece que o mesmo efeito não é observado no conteúdo de óleos (WAN et al., 2002).

Característica exclusiva das leguminosas é a formação de nódulos nas raízes e fixação do nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>), recurso essencial na formação de biomoléculas. O número e qualidade de nódulos na raiz determinam o estado nutricional da planta e, como o sal afeta a nodulação da soja, ele reduz a eficiência na fixação de nitrogênio e diminui o número e biomassa de nódulos (ELSHEIKH e WOOD, 1995). De acordo com Duzan e colaboradores

(2004) um dos motivos seria que o estresse salino inibe a deformação das raízes quando da percepção de fatores Nod (determinantes no processo de nodulação) e, desta forma, dificulta o início do processo de simbiose.

De acordo com Phang e colaboradores (2008), em soja, os mecanismos de tolerância ao sal podem ser divididos em quatro categorias principais: (i) manutenção da homeostase dos íons; (ii) ajuste na resposta ao estresse osmótico; (iii) restauração do balanço oxidativo; (iv) outras alterações metabólicas e estruturais.

Os autores ainda ressaltam que a capacidade diferencial na tolerância a sal demonstrada por diferentes germoplasmas é determinada pela sua eficiência em operar e coordenar estes sistemas.

Segundo Wang e colaboradores (2003), atualmente o melhoramento convencional (realizado através de cruzamentos) é o procedimento mais empregado para melhorar a tolerância da soja ao sal. Entretanto, a eficiência do método tradicional é muito limitada em virtude do longo ciclo de cruzamento, incompatibilidade na fertilização e a estreita ligação entre os *loci* que condicionam tolerância a estresse abiótico e características indesejáveis.

Não obstante os entraves vigentes, alguns trabalhos já demonstram o progresso realizado com estudos de transformação genética na planta modelo *A. thaliana*.

A família de fatores de transcrição tipo MYB, cujo envolvimento está bem caracterizado na regulação de muitos aspectos do crescimento, desenvolvimento, metabolismo e resposta a estresses variados, teve três de seus membros (*GmMYB76*, *GmMYB92*, e *GmMYB177*) estudados por Liao e colaboradores (2008b). No referido trabalho, plantas de *A. thaliana* portando construções com os respectivos transgenes responderam de melhor maneira que plantas controle, quando expostas a altas concentrações de sal e frio.

Wei e colaboradores (2009) superexpressaram em plantas de *A. thaliana* o gene *GmPHD2*, um possível regulador transcricional, que diminuiu o estresse oxidativo gerado por

espécies reativas de oxigênio (ERO) e possibilitou maior tolerância a sal nas plantas portando o inserto.

A tecnologia na produção de plantas transgênicas indubitavelmente continuará a auxiliar a busca por mecanismos subjacentes à tolerância ao excesso de sal, apesar da complexidade inerente ao processo.

#### 1.4 SECA

O déficit hídrico elicitava um complexo conjunto de respostas que começa com a percepção do estresse, o qual inicia uma ou mais rotas de transdução de sinal, findando em mudanças em nível celular, fisiológico e de desenvolvimento. O conjunto destas respostas depende da severidade e duração do estresse, do genótipo da planta, do estágio de desenvolvimento e do contexto ambiental circundante. Como o déficit celular de água pode resultar de estresses, tais como seca, sal e baixa temperatura, tais fatores estabelecem um grau de complexidade inerente ao estudo da elucidação de respostas que estejam envolvidas no aumento da tolerância ao estresse.

Complexos processos regulatórios e de sinalização, a maioria dos quais não elucidados, controlam a expressão de genes durante o déficit hídrico, sendo que muitos estresses estão conectados na mesma rota de transdução ou em uma rota similar, o que se evidencia pelo envolvimento de ABA na indução de genes em diferentes condições ambientais adversas.

Genes com variadas funções e modificações na expressão gênica regem o controle das respostas de curta e longa duração. À medida que as condições tornam-se mais severas, acentua-se a perda de água na célula e processos regulatórios são iniciados com vistas a ajustar o metabolismo celular às novas condições vigentes (BRAY, 1993). Riccardi e

colaboradores (1998) apontam o déficit hídrico como o principal limitante na manutenção da homeostase celular, haja vista que quando de sua restrição decorre redução do crescimento das partes aéreas e, em menor extensão, do sistema radicular.

Em virtude das restrições que o déficit hídrico impõe ao desenvolvimento vegetal, vários mecanismos evoluíram nas plantas como forma de sobrepujar esta limitação. Turner e colaboradores (2001) classificam estes mecanismos em três grupos: escape da seca (*drought escape*), evitação à seca (*drought avoidance*) e tolerância à seca (*drought tolerance*). Escape da seca, primeiro mecanismo, permite que a planta complete seu ciclo de vida durante o período em que o suprimento de água é suficiente, antes do começo da estiagem. Normalmente, o ciclo de vida é curto e as plantas produzem algumas sementes, ao invés da completa perda da safra. O segundo mecanismo, evitação à seca, envolve estratégias que possibilitam à planta manter altos níveis de água durante períodos de estresse, seja através da absorção eficiente de água pelas raízes ou por uma redução na evapotranspiração nas partes aéreas. O terceiro mecanismo, tolerância à seca, permite que a planta mantenha turgor e continue seu metabolismo, mesmo com baixo potencial de água, por exemplo, quando da síntese de osmoprotetores ou osmólitos.

Desta forma, em locais onde a água é o elemento limitante, o melhoramento genético visando menor suscetibilidade é uma opção atrativa economicamente. No cultivo de soja, a seca reduz aproximadamente 40% da produção (SPECHT et al. 1999), sendo a falta de água na fase do início do crescimento reprodutivo (floração e formação da vagem) determinante na redução da produtividade (MANAVALAN et al., 2009). Liu e colaboradores (2003) apontam que o ABA produzido nas raízes durante o período de déficit hídrico pode se mover até as estruturas reprodutivas, causando aborto da vagem, provavelmente por inibir a divisão celular dos ovários.



Carter e colaboradores (1999) [apud Manavalan et al. (2009)] salientam que o progresso no melhoramento visando resistência à seca tem sido lento e que existe uma série de razões para que isto aconteça:

- (i) identificar linhagens com maior potencial de rendimento sob condições ótimas de umidade é um importante critério de seleção em soja. Contrariamente, a avaliação de linhagens oriundas de ambientes de baixo rendimento, sob condição de seca, geralmente não é considerada, uma vez que pequenas diferenças de rendimento entre linhagens não separam genótipos de alto rendimento de genótipos de baixo rendimento;
- (ii) historicamente, a ênfase no cultivo de soja tem sido direcionada à busca por resistência a fatores bióticos, ao invés de abióticos, tais como a seca, devido à complexidade na avaliação destas características, o que resultou em uma estreita base genética para iniciar programas de melhoramento visando resistência à seca;
- (iii) a tolerância à seca é governada por vários fatores complexos, incluindo o genótipo, o meio ambiente e a interação de ambos.

O desenvolvimento de novas cultivares de soja, com menor suscetibilidade ao déficit hídrico, englobará uma maior compreensão das respostas fisiológicas e bioquímicas, bem como das redes regulatórias dos genes envolvidos neste processo, fornecendo recursos chave para o melhoramento tão almejado.

A aplicação do conhecimento emergente na engenharia genética de plantas já tem conduzido a exemplos de melhoramento na tolerância ao estresse hídrico em diversas espécies (NELSON et al. 2007; RIVERO et al. 2007; HU et al. 2008). Os genes candidatos identificados em soja são geralmente avaliados com relação a sua capacidade em aumentar a tolerância ao estresse em *A. thaliana* antes de prosseguir com sua introdução na referida leguminosa (MANAVALAN et al., 2009).

Chen e colaboradores (2006) isolaram o gene *GmDREB* de *G. max*, homólogo ao gene *AtDREB* de *A. thaliana* e o superexpressaram de forma constitutiva na planta modelo. Sob condições de estresse salino e déficit hídrico, a taxa de sobrevivência das plantas transgênicas de *A. thaliana* foi maior quando comparado às plantas não transformadas. Ademais, estas não apresentaram nenhum tipo de retardo ou anomalia no crescimento, diferentemente do constatado por Kasuga e colaboradores (1999) quando da transformação de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) utilizando o gene *DREB1A* de *A. thaliana* sob ação de um promotor constitutivo.

Em outro trabalho com transformação de tabaco (RODRIGUES et al., 2006), o gene *GmTP55* foi capaz de conferir maior turgidez às linhagens transgênicas sob progressiva condição de seca. Depois de duas semanas de desidratação, um fenótipo mais tolerante foi claramente desenvolvido pelas linhagens transformadas expressando o transgene.

Zhou e colaboradores (2008) trabalhando com uma série de genes da família WRKY, cujo papel na resposta abiótica ainda permanece obscuro, identificaram o gene *GmWRKY54* e o superexpressaram em *A. thaliana*, o que conferiu maior tolerância ao estresse ocasionado pela seca.

Cheng e colaboradores (2008) superexpressaram um fator de transcrição membro da família *GmERF* (*Ethylene Response Factor* - fator de resposta a etileno), denominado *GMCHI*, e obtiveram um aumento na sobrevivência das plantas transgênicas de *A. thaliana* submetidas a condições de déficit hídrico. No ano seguinte Zhang e colaboradores (2009) superexpressaram um outro membro desta família, denominado *GmERF3*, em tabaco e as plantas transformadas contendo o referido transgene apresentaram maiores níveis de prolina e carboidratos solúveis em condição de seca, possibilitando uma melhor resposta durante o período.

Xie e colaboradores (2009) estudaram dois fatores de transcrição do tipo tripla-hélice (*GmGT-2A* e *GmGT-2B*) e caracterizaram seu papel na tolerância ao estresse abiótico. A superexpressão de ambos os membros, em *A. thaliana*, possibilitou determinar que os mesmos conferiram tolerância a sal, frio e seca através da regulação de um grupo comum e específico de genes.

Mais recentemente, Zhang e colaboradores (2010) isolaram e caracterizaram um novo gene, denominado glicogênio sintetase quinase-3, *GmGSK*. *Saccharomyces cerevisiae* foi transformada com vistas à superexpressar a proteína codificada por este gene e os transformantes foram submetidos e examinados sob variadas adversidades abióticas. Nos resultados, os organismos transgênicos melhoraram a tolerância a sal e seca, especialmente no tratamento com  $\text{NaHCO}_3$ . No mesmo ano Zhou e colaboradores (2010) clonaram e caracterizaram uma enzima conjugada à ubiquitina, codificada pelo gene *GmUBC2*, e demonstraram que plantas de *A. thaliana* superexpressando a proteína foram mais tolerantes à salinidade e à seca, quando comparadas com plantas controle selvagens. Os autores ainda sugeriram que o referido gene deva estar envolvido na regulação da homeostase iônica, síntese de osmólitos e resposta a estresse oxidativo. Com base nos resultados, os autores sugerem que a modulação na rota de ubiquitinação possa ser um meio efetivo, no que concerne a melhoras na tolerância a sal e seca, em plantas geneticamente modificadas.

Apesar de um considerável aporte sustentar o desenvolvimento de culturas transgênicas menos suscetíveis ao déficit hídrico por meio da engenharia genética, até o momento somente dois trabalhos foram publicados em soja. É provável que o baixo número de estudos com transformação na referida espécie seja decorrente das baixas taxas de transformação e regeneração, bem como a frequente obtenção de plantas quiméricas (CHANDRA e PENTAL, 2003).

Plantas transgênicas, superexpressando o gene  $\Delta$ 1-pirrolina-5-carboxilato sintetase, P5CR, de *A. thaliana*, apresentaram maior tolerância à seca devido ao aumento no nível de prolina livre e RWC (do inglês, *relative water content* – conteúdo relativo de água), bem como reduzido nível das espécies reativas de oxigênio, particularmente peróxido de hidrogênio (DE RONDE et al., 2004a; DE RONDE et al., 2004b; SIMON-SARKADI et al. 2005; KOCSY et al., 2005).

Xue e colaboradores (2007) obtiveram plantas transgênicas de soja superexpressando constitutivamente o gene NTR1 (codificante de uma carboxi metiltransferase do ácido jasmônico), o que aumentou a tolerância ao déficit hídrico. No entanto, as plantas transformadas apresentaram drásticas alterações no formato da folha, muito embora nenhuma inibição da germinação ou crescimento tenha sido observada no estudo.

Mais recentemente, Beneventi e colaboradores (COMUNICAÇÃO PESSOAL) conseguiram aumentar a tolerância ao déficit hídrico em soja transferindo um fator de transcrição de *A. thaliana* (DREB1A/CBF3) regulado por um promotor induzível por estresse (RD29A).

Muitos esforços têm sido direcionados à prospecção e isolamento de genes relacionados ao déficit hídrico, tanto nos aspectos fisiológicos quanto bioquímicos da resposta à seca. A descoberta de novos fatores de transcrição e o estudo de seus respectivos promotores fornecerá ferramentas e recursos de suma importância para o desenvolvimento de cultivares transgênicas de soja, melhoradas no que tange a uma menor suscetibilidade à seca e, conseqüentemente, um maior rendimento na produção.

### 1.5 GENES *ASR* (*ABA*, *STRESS AND RIPENING*)

Genes codificantes de proteínas *ASR* (do inglês, *ABA* [*Abscisic acid*], *stress and ripening*) foram inicialmente descritos em tomate (*Lycopersicon esculentum*) por Iusem e colaboradores (1993), através do *screening* de uma biblioteca genômica obtida a partir do fruto da respectiva planta. Estudos posteriores identificaram este gene em diversas espécies de monocotiledôneas, dicotiledôneas e gimnospermas, como batata (*Solanum chacoense* e *Solanum tuberosum*, SILHAVY et al., 1995; *Solanum brevidens*, DÓCZI et al. 2002), beringela (*Solanum melongena*; SILHAVY et al., 1995), pomelo (*Citrus maxima*, CANEL et al., 1995), pinheiro (*Pinus taeda*, CHANG et al., 1996), damasqueiro (*Prunus armeniaca*, MBEGUIE-A-MBEGUIE et al., 1997), lírio (*Lilium longiflorum*, WANG et al., 1998), milho (*Zea mays*, RICCARDI et al., 1998), arroz (*Oriza sativa*, VAIDYANATHAN et al., 1999), pêra japonesa (*Pyrus pirifolia*, ITAI et al., 2000), melão (*Cucumis melo*, HONG et al., 2002), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, SUGIHARTO, et al., 2002), grafonola-da-praia (*Calystegia soldanella*, HARA et al. 2002), uva (*Vitis vinifera*, ÇAKIR et al., 2003), *Gingko biloba* (SHEN et al., 2005), banana (*Musa acuminata*, XU et al., 2007) e, mais recentemente, feijão (*Phaseolus vulgaris*, KAVAR et al., 2008). Porém, apesar da ampla distribuição de genes *Asr* entre as espermatófitas, onde formam pequenas famílias gênicas, surpreendentemente tais genes estão ausentes na planta modelo *A. thaliana* (FRANKEL et al., 2006).

Segundo Amitai-Zeigerson e colaboradores (1995) genes cuja expressão é induzida por estresses ambientais podem ser divididos em dois grupos: aqueles cuja indução permanece acentuada durante todo o período em que o organismo está sob condição de estresse e aqueles cuja expressão modifica-se de maneira transiente. Estudos iniciais já indicavam que os genes *Asr* pertencem ao segundo grupo, uma vez que os trabalhos

demonstravam que seus níveis proteicos e de transcritos acentuam-se transientemente durante estresse salino, estresse osmótico, tratamento com ABA, seca e frio (SILHAVY et al. 1995; AMITAI-ZEIGERSON et al., 1995; SCHNEIDER et al., 1997).

Padmanabhan e colaboradores (1997) registraram que os padrões de expressão dos genes *Asr* variam entre diferentes tecidos de uma mesma planta, bem como entre diferentes espécies. Um exemplo é a indução preferencial do gene homólogo de *Asr* (*lp3*) em raiz de *Pinus taeda* durante estresse decorrente de déficit hídrico, e a indução acentuada do gene *Asr1* em folhas de *Lycopersicon esculentum*. Neste ponto, cabe ressaltar que proteínas ASR devem possuir atividade não restrita ao estresse, pois também são encontradas em plantas não submetidas a regimes abióticos que destoem da normalidade (AMITAI-ZEIGERSON, 1995).

Os genes *Asr* também são regulados ao longo do desenvolvimento das plantas, sendo expressos durante a maturação do pólen (WANG et al., 1998), no amadurecimento do fruto em várias espécies de plantas (MASKIN et al., 2001) e no metabolismo da glicose (FRANKEL et al., 2007).

Uma característica pertinente a todos os genes *Asr* conhecidos é a presença de duas regiões altamente conservadas (YANG et al., 2008). De acordo com Çakir e colaboradores (2003) e Kalifa e colaboradores (2004a) a primeira região é composta por um pequeno trecho de seis a sete resíduos de histidina na porção amino-terminal, onde existe uma sequência específica com atividade de ligação a DNA dependente de  $Zn^{+2}$ . A segunda região compõe a maior parte da sequência carboxi-terminal, com cerca de aproximadamente 70 aminoácidos e, normalmente, contém um sinal de localização nuclear (NLS - do inglês, *nuclear localization signal*), formando o domínio conservado WDS (do inglês, *water, deficit, stress*), característico da família.

Uma série de estudos tem documentado a localização de proteínas ASR tanto no citoplasma quanto no núcleo, sendo que no último possivelmente elas regulam promotores

específicos (GILAD et al. 1997; ÇAKIR et al., 2003; WANG et al., 2005; MASKIN et al. 2007, YANG et al, 2008). É a localização nuclear e a capacidade de ligação a DNA que indicam que estas proteínas atuam como fatores de transcrição (FRANKEL et al., 2007).

Através de ensaios de retardamento em gel Çakir e colaboradores (2003) demonstraram, *in vitro*, que a proteína ASR de uva (*Vitis vinifera* – *VvMSA*) se liga ao promotor do gene que codifica uma proteína transportadora de hexose – *VvHT1*. De acordo com Carrari e colaboradores (2003), esta importante descoberta permite estabelecer novos rumos para o estudo da resposta cruzada entre o metabolismo de açúcares e sinalização de ABA em frutas, gerando perspectivas na elucidação de aspectos relacionados à interconexão açúcar-hormônio.

De acordo com Goldgur e colaboradores (2007), na ausência de zinco a proteína ASR1 de tomate é um monômero, porém, quando da presença dos íons deste metal a molécula torna-se homodímera. O zinco seria responsável por condicionar uma estruturação mais ordenada à ASR1, o que promoveria sua dimerização. A alternância entre a estrutura desordenada (*unfolded*) e ordenada (*folded*) consistiria no mecanismo de regulação da atividade de ASR1. Os autores ainda propõem que a ligação de ASR1 ao DNA ocorre quando a proteína está ordenada, uma vez que esta ligação é dependente de zinco, enquanto no citosol vigora a forma desordenada da proteína.

Yang e colaboradores (2005) propõem que as quantidades substanciais da proteína homóloga LLA23 de lírio (*Lilium longiflorum*) existentes no citoplasma dos grãos de pólen são uma evidência da dupla função que essa proteína exerce sob condição de déficit hídrico, atuando tanto como molécula reguladoras (no núcleo) quanto protetoras (no citoplasma). Houde e colaboradores (1995) sugerem que a translocação entre os dois compartimentos possa ser utilizada para regular a atividade proteica, ou mesmo que uma proteína pode exibir distintos papéis em cada compartimento.

Neste contexto, Konrad e Bar-Zvi (2008) propõem que a forma citosólica desordenada (não ligada a zinco) da proteína ASR1 de tomate atue como chaperona, prevenindo a desnaturação e agregação de proteínas em condição de estresses abióticos.

Em virtude do potencial agrônômico na utilização de genes *Asr* em trabalhos de melhoramento genético, começa a emergir uma nova abordagem biotecnológica. Em tabaco, a superexpressão do gene *Asr1* de tomate resultou em maior tolerância a sal, além de modular a expressão de outros genes (KALIFA et al. 2004b). Plantas transgênicas de *A. thaliana* superexpressando o gene ortólogo de lírio *lla23* aumentaram a tolerância à seca e salinidade (YANG et al., 2005). O gene *Asr1* de milho (*Zea mays*), proposto como candidato de uma QTL responsiva a estresse hídrico (DE VIENNE et al, 1999) confirmou as predições iniciais quando superexpresso nesta planta (JEANNEAU, M. et al., 2002). Apesar do consistente aporte fornecido pelos dados literários e experimentais, até o presente momento não existe registro de estudo abordando a família de genes *Asr* em soja.



## 2 OBJETIVOS

De maneira geral, este trabalho teve como escopo fornecer maiores elucidações acerca dos genes da família *Asr* de soja.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os genes que compõem a família *Asr* de soja;
- Avaliar o perfil de expressão dos genes *Asr* de soja sob condições de estresse abiótico (sal, seca e aplicação exógena de ácido abscísico);
- Isolar e clonar os genes *Asr* de soja em vetores que viabilizem a transformação genética de plantas;
- Promover a transformação genética de *Arabidopsis thaliana* com os genes codificantes de proteínas ASR de soja, com vistas a avaliar seu potencial emprego em futuros trabalhos de transformação genética com a leguminosa.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 IDENTIFICAÇÃO DA FAMÍLIA ASR DE SOJA, CONSTRUÇÃO DE *PRIMERS* (OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES) E ANÁLISES COMPARATIVAS ENTRE SEQUÊNCIAS

Com base no banco de dados do projeto de sequenciamento genômico e de ESTs de soja (<http://www.phytozome.org/> e <http://soybeanbreederstoolbox.org/>), bem como no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), foram identificadas as sequências dos genes da família *Asr* na planta, utilizando como isca (*query*) a sequência do mRNA de um gene *Asr* (GI:38679404) da leguminosa. Tal abordagem foi necessária uma vez que estes genes estão ausentes no genoma da planta modelo *Arabidopsis thaliana*. As informações obtidas permitiram desenhar *primers* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) para os experimentos de superexpressão, localização subcelular e RT-qPCR em tempo real. Neste último, os *primers* foram projetados para produzir amplicons entre 100 e 250 pares de base, flanqueando o íntron, com vistas a descartar possível contaminação. As análises comparativas entre sequências de diferentes genes foram realizadas com auxílio do programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007), onde foram alinhadas automaticamente pelo CLUSTAL W (utilizando dados padrão do CLUSTAL – “default”).

#### 3.2 PROCEDIMENTO PARA AVALIAR O PERFIL DE EXPRESSÃO DA FAMÍLIA ASR NOS EXPERIMENTOS COM ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA) E SAL (NaCl)

Sementes de soja da cultivar Conquista foram plantadas em copos plásticos (200 ml) contendo substrato de vermiculita e regadas com meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) contendo metade da concentração predita pelos autores, com vistas a viabilizar seu

desenvolvimento. As culturas foram mantidas durante todo o experimento à temperatura constante de  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro, com intensidade luminosa de  $22,5 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Para cada tratamento, duas horas após o início do período de luz, plantas com duas semanas de idade foram colocadas em solução hidropônica contendo meio MS com metade da força (*half strenght*) e separadas em dois grupos. Amostras de tecido radicular e foliar submetidas ao tratamento e amostras não tratadas, mas mantidas sob as mesmas condições de cultivo durante todo o período, foram coletadas em tempos determinados. Antes da coleta as raízes foram rapidamente lavadas com água, com vistas a remover a vermiculita aderida ao tecido.

### **3.2.1 Tratamento com ácido abscísico (ABA)**

Com vistas a mimetizar os efeitos de estresse abiótico nas plantas em estudo, ABA foi adicionado à solução hidropônica, em uma concentração final de  $100 \mu\text{M}$  (LIAO, et al., 2008). No grupo composto pelas plantas controle a solução hidropônica não teve o acréscimo do fitormônio. As amostras foram coletadas 1 hora e 4 horas após o início do tratamento.

### **3.2.2 Tratamento com sal (NaCl 75 e 150 mM)**

O sal foi adicionado à solução hidropônica das plantas a serem tratadas, enquanto que o grupo controle permaneceu no mesmo meio hidropônico, no entanto, livre do agente estressor. No referido experimento as coletas foram realizadas quando transcorridas 6 horas do início do tratamento (JI et al., 2006).

### 3.3 TRATAMENTO COM SECA

O material analisado proveio de dois experimentos. No experimento conduzido na sede da EMBRAPA-SOJA (Londrina, PR), plantas de soja com três semanas de idade foram retiradas da solução hidropônica e expostas ao ambiente. Amostras de tecido foliar das cultivar BR16 (menos suscetível ao déficit hídrico) e EMBRAPA-48 (mais suscetível ao déficit hídrico) foram coletadas nos tempos de 0, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 minutos de tratamento, imediatamente colocadas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

No experimento conduzido por nosso grupo, plantas da cv. Conquista, com duas semanas de idade, cultivadas em copos (300 ml), foram expostas a um período de déficit hídrico, por meio da contenção de água. Amostras de raízes e folhas foram coletadas a cada dois dias após o início do tratamento.

### 3.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E TRATAMENTO COM DNASE

Amostras de tecido radicular e foliar de plantas de soja foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e pulverizadas em morteiro. Aproximadamente 100 mg do tecido macerado foi homogeneizado em 1 ml de Trizol (Invitrogen), em microtubo. Posteriormente, estas amostras foram incubadas durante 5 minutos à temperatura entre  $15^{\circ}\text{C}$  e  $30^{\circ}\text{C}$ , com vistas a permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu\text{l}$  de clorofórmio para cada 1 ml de Trizol usado inicialmente. Após vigorosa agitação com duração de 15 segundos, os tubos de microcentrífuga contendo as amostras homogeneizadas foram novamente incubados por um período de 2 a 3 minutos à temperatura entre  $15^{\circ}\text{C}$  e  $30^{\circ}\text{C}$ . Ao término, estas amostras foram dispostas em uma centrífuga refrigerada ( $4^{\circ}\text{C}$ ) e submetidas a um processo de

centrifugação a 12.000 rpm durante 15 minutos. Este procedimento possibilita a separação de fases. O RNA, presente na fase aquosa, foi coletado e transferido para um novo tubo onde foram adicionados 500 µl de isopropanol para cada ml de Trizol empregado no início da extração. Após 10 minutos de incubação em temperatura entre 15°C e 30°C, as amostras foram novamente centrifugadas durante 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA lavado com 1 ml de etanol 70% para cada ml de Trizol empregado no início do processo. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 7.500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o RNA permaneceu em temperatura ambiente até a total evaporação do álcool. Por fim, o RNA foi suspenso em 30 µl de água MilliQ autoclavada.

Com vistas a evitar contaminação com DNA genômico, antes da síntese de cDNA as amostras foram tratadas com Dnase (Promega), de acordo com as orientações do fabricante.

### 3.5 SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima transcriptase reversa M-MLV RT (Invitrogen ou Promega), de acordo com instrução dos fabricantes, sendo que em ambos os casos o volume final da reação foi de 50 µl. A solução estoque foi preparada diluindo dez vezes o cDNA obtido. Para as PCRs quantitativas em tempo real (RT-qPCR), a solução estoque de cDNA foi diluída mais dez vezes (diluição final 1:100). Experimentos com o gene *GmAsr2* foram conduzidos utilizando uma diluição final de 1:20.

### 3.6 AMPLIFICAÇÃO DOS MEMBROS DA FAMÍLIA ASR DE SOJA UTILIZANDO A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As reações da PCR para amplificar os genes *GmAsr1*, *GmAsr2* e *GmAsr3* foram realizadas utilizando como molde cDNA obtido a partir de RNA de folhas de soja não estressadas (controle). Em cada reação utilizou-se MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), tampão (1X), mistura de dNTPs (0,25 mM); *primer forward* (0,5 µM) e *primer reverse* (0,5 µM), Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (1u) e cDNA (aproximadamente 50 ng µl<sup>-1</sup>). Para os genes *GmASR1* e *GmASR3* a mistura foi submetida, durante 2 minutos, à temperatura de 94°C e a 35 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturação das fitas de DNA, 30 segundos a 60°C para anelamento dos *primers*, e 30 segundos a 72°C para a adição de nucleotídeos às fitas nascentes de DNA. As reações findaram com um período de extensão final a 72°C durante 5 minutos. Para o gene *GmASR2* a mistura foi submetida, durante 2 minutos, a temperatura de 94°C e a 45 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturação das fitas de DNA, 30 segundos a 70°C para anelamento dos *primers*, e 30 segundos a 72°C para a adição de nucleotídeos às fitas nascentes de DNA. A reação findou com um período de extensão final a 72°C durante 5 minutos.

Os produtos de DNA obtidos pela PCR foram corados com brometo de etídeo e analisados por eletroforese em gel de agarose 2 % em tampão TBE 1X (89 mM Tris-OH, 2 mM EDTA, 89 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH 8.2) sob corrente elétrica contínua de 100 mA. As bandas foram visualizadas em transiluminador de luz UV e as amostras comparadas com marcador de peso molecular conhecido (1 kb *ladder* - Invitrogen).

A Tabela 1 descreve a sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados na amplificação dos genes *Asr* de soja, bem como do gene *hpt* (gene que codifica uma higromicina fosfotransferase), presente nos vetores de localização subcelular e superexpressão e que é responsável por conferir resistência ao antibiótico higromicina.

**Tabela 1.** *Primers* utilizados na amplificação dos genes *GmAsr1*, *GmAsr2* e *GmAsr3*. A sequência CACC (em negrito), corresponde às quatro bases inseridas no *primer forward*, para a correta clonagem no vetor pENTR (para maiores esclarecimentos ver item 3.9)

<i>Primer</i>	<i>Forward (primer direto)</i> <i>Reverse (primer reverso)</i>	Sequência dos <i>primers</i> (5' – 3')
<i>GmAsr1</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	<b>CACC</b> ATGGCCGAAGAGAAACACCACAAG TCAGCCAAAGAGATGGTGGTGCT
<i>GmAsr2</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	<b>CACC</b> ATGGCCGAAGAGAAACACCACAAG TCAGCCAAAGAGATGGTGGTGCT
<i>GmAsr3</i>	<i>Forward (5' UTR)</i> <i>Reverse</i>	<b>CACCAATTAATCCCTTAATTGCAAGCAT</b> GTTTCAGCCAAACAGATGGTG
<i>Hpt</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	GGCTATGGTTGGATTGATGG TCCAGGAACAGTGAGCCTG

### 3.8 RT-qPCR EM TEMPO REAL

As análises de RT-qPCR em foram realizadas no aparelho “StepOnePlus™ Real-Time PCR System”, da Applied Biosystems. As reações consistiram em uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C seguida de 40 ciclos de 10 segundos a 94°C, 15 segundos a 60°C e 15 segundos a 72°C. Posteriormente, as amostras permaneceram durante 2 minutos a 40°C a fim de viabilizar o reanelamento e, finalmente, aquecidas de 55°C a 99°C para a obtenção de dados relativos à curva de desnaturação do produto amplificado.

As RT-qPCRs foram realizadas com a utilização de 12,5 µl da amostra de cDNA diluído (1:100), 2,5 µl do tampão PCR 10X (Tris/HCl a 100 mM, (pH 8,0), KCl a 500 mM), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,5 µl de dNTPs a 5 mM, 0,5 µl de cada *primer* 10 µM, 3,45 µl de água, 4,0 µl de SYBR-Green (1:100000) e 0,05 µl de *Platinum Taq Dna Polymerase* (5 U µl<sup>-1</sup>; Invitrogen). O volume final de cada reação foi de 25 µl.

Embora normalizadores validados por dois grupos (JIAN et al., 2008; LIBAULT et al., 2008) tenham sido utilizados em experimentos piloto, dois deles (F-box e Metaloprotease; LIBAULT et al., 2008) se mostraram mais estáveis nos experimentos realizados (conforme resultado do programa geNorm - <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) e serviram

como referência para as análises de RT-qPCR. Como controle positivo nos experimentos de sal e seca foi utilizado o gene da asparagina sintetase (*GmAS*), cuja indução sob tais condições está bem caracterizada em soja (HUGHES et al. 1997). No estudo realizado com ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) o gene codificante de uma proteína relacionada à patogênese de soja (*GmPR4*) foi escolhido como controle para avaliar a modulação da expressão gênica (GRAHAM et al., 2003).

O cálculo baseado no método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  descrito por Livak e Schmittgen (2001), permitiu validar, bem como analisar os dados obtidos nos experimentos. Neste ponto, deve-se ressaltar que tanto na situação de controle quanto na situação de tratamento, para cada gene estudado foram utilizadas quatro amostras biológicas (cada uma composta por um *pool* de duas plantas), sendo que cada uma destas amostras foi submetida a quatro reações de qRT-PCR em tempo real, com vistas a verificar o desvio padrão entre as pipetagens realizadas. Duas exceções ocorreram com os experimentos realizados na EMBRAPA-SOJA de Londrina (seca e ferrugem asiática) onde foram utilizadas somente três amostras biológicas (com *pool* de 5 plantas). Empregou-se o teste T de Student (Microsoft® Office Excel 2007), a um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ), com vistas a validar as variações observadas nos tratamentos.

Na tabela a seguir (Tabela 2) estão descritos os *primers* utilizados nas análises de expressão dos genes *Asr* por RT-qPCR em tempo real.

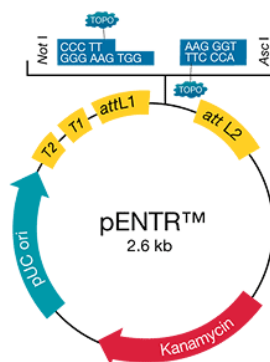


**Tabela 2.** *Primers* utilizados nas análises de expressão dos genes *Asr* por qRT-PCR em tempo real

<i>Primer</i>	<i>Forward (primer direto)</i> <i>Reverse (primer reverso)</i>	Sequência dos nucleotídeos dos <i>primers</i> 5' – 3'
<i>GmAsr1</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	AAACCAAGTGGTGGCTATGG TCCCTGCCTTGTGCTTCTCA
<i>GmAsr2</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	GGAGGAGAAGCACCACCAGAG CATCTTGCTCCTTTGCTTCC
<i>GmAsr3</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	CTGAGGAGAAGCACCACCAC CATGCTCTGGGTCTTTCTTG
<i>GmF-box</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	AGATAGGGAAATGGTGCAGGT CTAATGGCAATTGCAGCTCTC
<i>GmMetalo</i> (metaloprotease)	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	ATGAATGACGGTTCCCATGTA GGCATTAAAGGCAGCTCACTCT
<i>GmAS</i> (asparagina sintetase)	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	GGCTATGGTTGGATTGATGG TCCAGGAACAGTGAGCCTG
<i>GmPR4</i> ( <i>phathogenesis related 4</i> )	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	AACCTTACTCATGGCGCAGT TGCTGCACTGATCTACGATTC

### 3.9 CLONAGEM NO VETOR DE ENTRADA PENTR

Os genes amplificados a partir do cDNA de soja foram inicialmente inseridos no vetor de entrada *Gateway pENTR* (Invitrogen, Figura 2) de acordo com o protocolo do fabricante. Neste sistema, o produto da PCR é diretamente clonado, de maneira direcionada, graças à adição de quatro bases no início do *primer forward* (CACC). A sequência no vetor de clonagem (GTGG) invade a região 5' do produto da PCR, anela-se às bases adicionadas, e estabiliza o produto da PCR na orientação correta. Por fim, a ligação dos produtos amplificados com pENTR foi catalisada pela enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). Os vetores pENTR recombinados com os genes de interesse foram inseridos em bactérias (*Escherichia coli*, linhagem Top10) através da eletroporação e selecionados com uma concentração de 50µg ml<sup>-1</sup> do antibiótico canamicina, marca de resistência do vetor (próximo item).



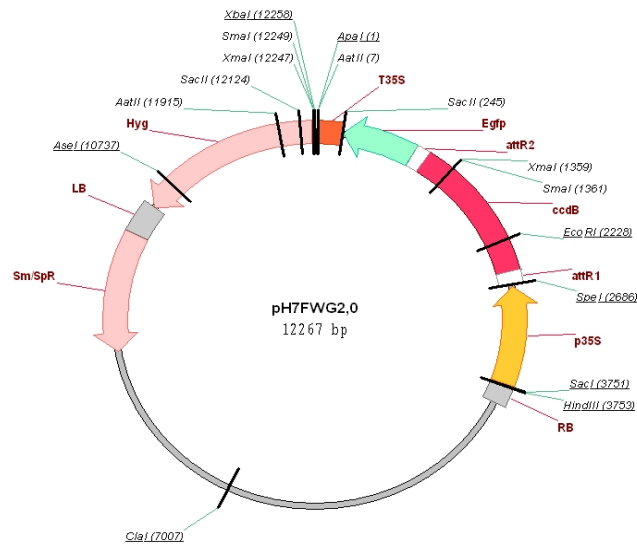
**Figura 2.** Vetor de entrada pENTR/D-TOPO. T1 e T2 – Sequências terminadoras de transcrição. attL1 e attL2 – Sítios de recombinação. *Kanamycin* – gene de resistência ao antibiótico canamicina. pUC ori – Origem de replicação.

### 3.10 TRANSFORMAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* (LINHAGEM TOP10) POR ELETROPORAÇÃO

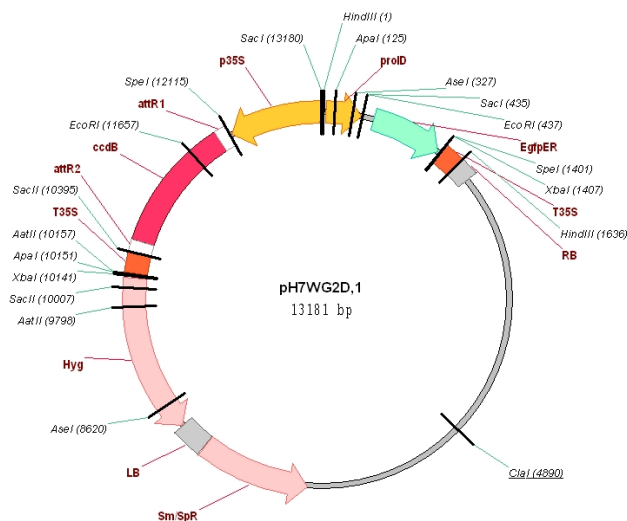
Bactérias eletrocompetentes foram preparadas de acordo com o protocolo descrito por OSWALD (2008). Para a transformação de *E. coli*, 1 µl do produto da reação de ligação (pENTR*GmAsr1*, pENTR*GmAsr2* e pENTR*GmAsr3*) foi homogeneizado com 90 µl de bactérias e submetido a uma voltagem de 2.500 mV. Posteriormente, 400 µl de meio de cultura LB (Luria-Broth) líquido foram acrescentados à cubeta de eletroporação. O material foi transferido para um microtubo e mantido a 37°C durante 1 hora sob agitação, e, em seguida, a suspensão bacteriana foi plaqueada em meio LB semi-sólido contendo canamicina (50 µg ml<sup>-1</sup>), agente de seleção das bactérias transformadas (ver Figura 2). As placas foram mantidas em estufa a 37°C durante 24 horas. As colônias de bactérias que se multiplicaram no meio contendo o antibiótico de seleção foram incubadas por aproximadamente 15 horas em 3 ml de meio LB líquido contendo canamicina (50 µg ml<sup>-1</sup>). Após este período, realizou-se a extração de plasmídeo utilizando o Kit *DNA Purification System SV Minipreps* (Promega). A transformação das colônias foi confirmada por PCR, com *primers* específicos para cada gene (Tabela 2), bem como por sequenciamento.

### 3.11 CLONAGEM NO VETOR BINÁRIO PH7FWG2 PARA ESTUDOS DE LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR E NO VETOR BINÁRIO PH7WG2D PARA ESTUDOS DE SUPEREXPRESSION

Os plasmídeos pENTR*GmAsr1*, pENTR*GmAsr2* e pENTR*GmAsr3* foram utilizados para recombinação com os vetores de localização subcelular pH7FWG2 (Figura 3) e superexpressão pH7WG2D (Figura 4). O procedimento ocorreu de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante (Invitrogen). Cinquenta ng de pENTR, portando o produto da PCR clonado, foram adicionadas a 100 ng do vetor pH7FWG2 ou pH7WG2D, 1 µl de tampão (*LR Reaction Buffer 5X*), 1µl de *Clonase Enzyme Mix* e água em quantidade final de 8 µl. A reação foi incubada durante 1 hora a 25°C. Em seguida foram adicionados 2 µl de proteinase K (2 µg µl<sup>-1</sup>) e a reação foi incubada a 37°C durante 10 min. Após a recombinação, 2 µl da reação foram utilizados na transformação de *E. coli* (Top 10), por eletroporação, conforme descrito anteriormente. Os transformantes foram selecionados em placas contendo espectinomicina (100 µg ml<sup>-1</sup>) e, a seguir, incubados em LB líquido com este mesmo antibiótico. Os plasmídeos foram extraídos (SAMBROOK et al., 1989) e as clonagens foram confirmadas por PCR com os *primers* específicos para amplificação de cada gene *Asr* e para o gene *hpt* (Tabela 2). Posteriormente foram analisadas em eletroforese em gel de agarose 2 %.



**Figura 3.** Vetor pH7FWG2.0 (KARIMI et al., 2002) para estudos de localização subcelular em tecidos vegetais. RB e LB – *Right Border* e *Left Border*, respectivamente, para transformação de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. p35S – promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor. attR1 e attR2 – Sítios de recombinação. ccdB – gene que codifica uma proteína inibidora da proteína girase. Egfp – codifica uma proteína de fluorescência verde (GFP). T35S – Terminador 35S do vírus do mosaico da couve-flor. Hyg – codifica a higromicina fosfotransferase (resistência ao antibiótico higromicina). Sm/SpR – Resistência aos antibióticos estreptomomicina e espectinomomicina.



**Figura 4.** Vetor pH7WG2D (KARIMI et al., 2002) para estudos de superexpressão em tecidos vegetais. RB e LB – *Right Border* e *Left Border*, respectivamente, para transformação de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. p35S – promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor. attR1 e attR2 – Sítios de recombinação. ccdB – gene que codifica uma proteína inibidora da proteína girase. Egfp – codifica uma proteína de fluorescência verde (GFP). T35S – Terminador 35S do vírus do mosaico da couve-flor. Hyg – codifica a higromicina fosfotransferase (resistência ao antibiótico higromicina). Sm/SpR – Resistência aos antibióticos estreptomomicina e espectinomomicina.

### 3.12 TRANSFORMAÇÃO DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* (LINHAGEM LBA4404)

Bactérias eletrocompetentes foram preparadas de acordo com o protocolo descrito por OSWALD (2008). Para a transformação de *A. tumefaciens* (linhagem LBA4404), 1 µl do produto da reação de ligação (pH7FWG2*GmAsr1*, pH7FWG2*GmAsr2*, pH7FWG2*GmAsr3*, pH7WG2D*GmAsr1*, pH7WG2D*GmAsr2* e pH7WG2D*GmAsr3*) foi homogeneizado com 90 µl de bactérias e submetido a uma voltagem de 2.500 mV. Posteriormente, 400 µl de meio de cultura LB (Luria-Broth) líquido foram acrescentados à cubeta de eletroporação. O material foi transferido para um microtubo e mantido a 28°C durante 1 hora sob agitação, e, em seguida, a suspensão bacteriana foi plaqueada em meio LB semi-sólido contendo espectinomicina (100 µg ml<sup>-1</sup>, marca de resistência do vetor) e rifampicina (50 µg ml<sup>-1</sup>, marca de resistência cromossomal da bactéria), agentes de seleção das bactérias transformadas (ver Figuras 3 e 4). As placas foram mantidas em estufa a 28°C durante 48 horas. As colônias de bactérias que se multiplicaram no meio contendo os antibióticos de seleção foram incubadas por 48 horas em 3 ml de meio LB líquido contendo espectinomicina (100 µg ml<sup>-1</sup>) e rifampicina (50 µg ml<sup>-1</sup>). Após este período, foi realizada a extração dos plasmídeos utilizando o Kit *DNA Purification System SV Minipreps* (Promega). A transformação das colônias foi confirmada por PCR (genes *Asr* e gene *hpt*) e posterior visualização em gel de agarose 2 %.

### 3.13 TRANSFORMAÇÃO DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

*A. thaliana* (ecotipo Columbia) foi transformada pelo método adaptado de Clough e Bent (1998) [apud Trivilin (2008)]. Plantas nos estádios iniciais de florescimento (30 a 40% do total de inflorescências abertas) foram aspergidas com inóculo contendo células

transformadas de *A. tumefaciens* linhagem LBA4404 portando os vetores de superexpressão e localização subcelular descritos no item 3.11. Também foram transformadas plantas com os mesmos vetores, porém sem inserto de cDNA, para uso como controle nos experimentos.

Alguns protocolos utilizam vácuo para aumentar a infiltração de *A. tumefaciens*, mas neste caso o meio de infiltração foi composto por 5% de sacarose, 0,05% de surfactante *Silwet L77* em um volume final de 100 mL de água destilada e autoclavada, sendo aplicado aproximadamente 10 mL da solução em cada planta. Esta suspensão foi aspergida a uma distância de 30 cm, sendo distribuída uniformemente sobre a superfície das flores. Posteriormente, as plantas submetidas ao processo foram incubadas durante 24 horas em câmaras plásticas borrifadas internamente com água destilada. Após este período, foram removidas das câmaras plásticas e mantidas em câmaras de crescimento climatizadas a 20 +/- 2°C com foto período de 16 horas de luz. O procedimento de aspersão foi repetido 3 vezes, com intervalos de 48 horas, nas mesmas plantas, sendo estas mantidas nas condições ambientais citadas anteriormente. Após o processo de transformação, as plantas foram acondicionadas em câmaras de crescimento por aproximadamente 30 dias até a coleta total de sementes maduras.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS ASR DE SOJA

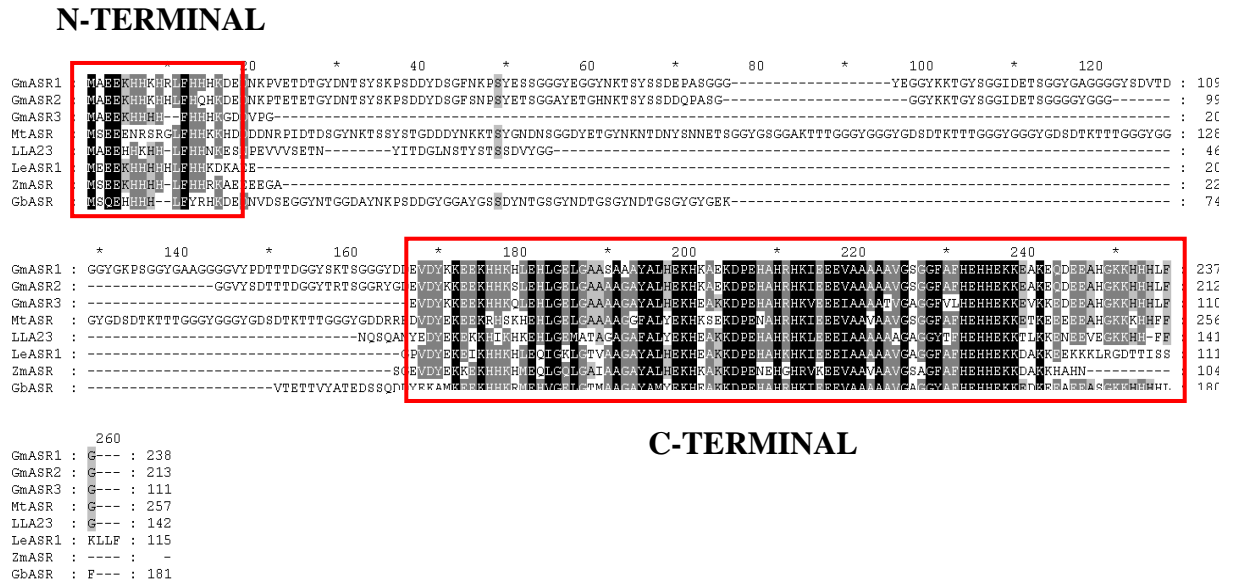
O mRNA de um gene *Asr* de soja (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi utilizado como isca (“*query*”) no banco de dados de sequenciamento da leguminosa (<http://www.phytozome.org/>), onde pode-se identificar três membros pertencentes a esta família. A expressão dos genes foi aferida quando da análise no banco de ESTs (<http://soybeanbreederstoolbox.org/>) de *Glycine max*.

A estrutura linear da sequência destes genes evidencia a presença de dois éxons e um íntron (anexo 1). *GmAsr1* (cromossomo 20) contém uma fase de leitura aberta de 717 pb codificando uma proteína de 238 aminoácidos (Glyma20g30720.1). *GmAsr2* (cromossomo 10 - Glyma10g36890.1) e *GmAsr3* (cromossomo 16 - Glyma16g28150.1) possuem fases de leitura aberta de 642 e 336 pb codificando proteínas de 213 e 111 aminoácidos, respectivamente. Nas proteínas predominam os aminoácidos alanina (Ala - A), glicina (Gly - G), glutamato (Glu - E), histidina (His - H) e lisina (Lys - K), o que parece ser uma característica de todas as proteínas ASR (SHEN et al., 2005).

Quando comparadas entre si (Figura 5), percebe-se que as sequências de aminoácidos de GmASR2 e GmASR3 apresentam regiões de deleção, em relação à sequência de GmASR1, sendo que em GmASR3 esta peculiaridade é mais acentuada. Não obstante, as sequências remanescentes permanecem altamente conservadas.

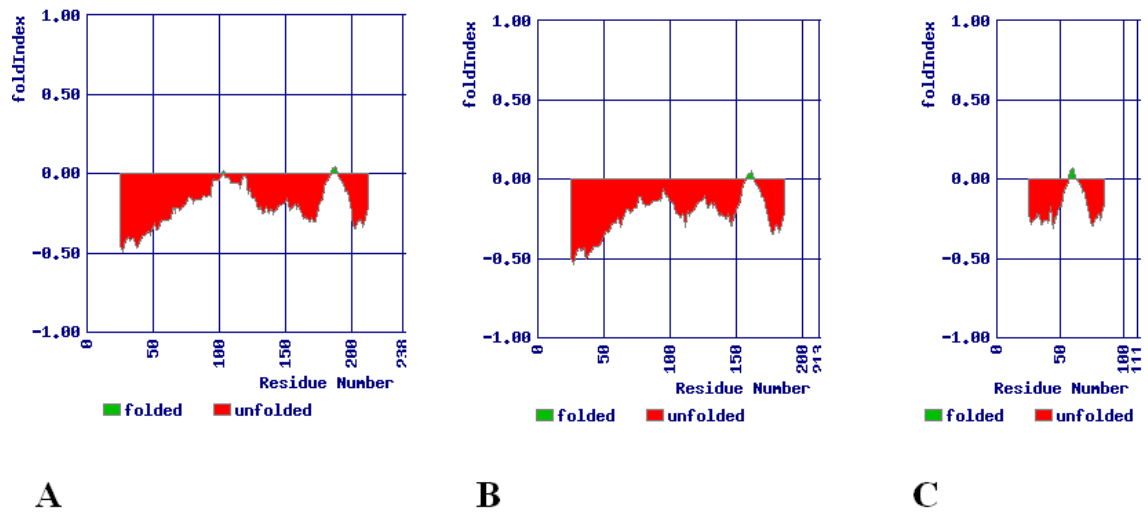






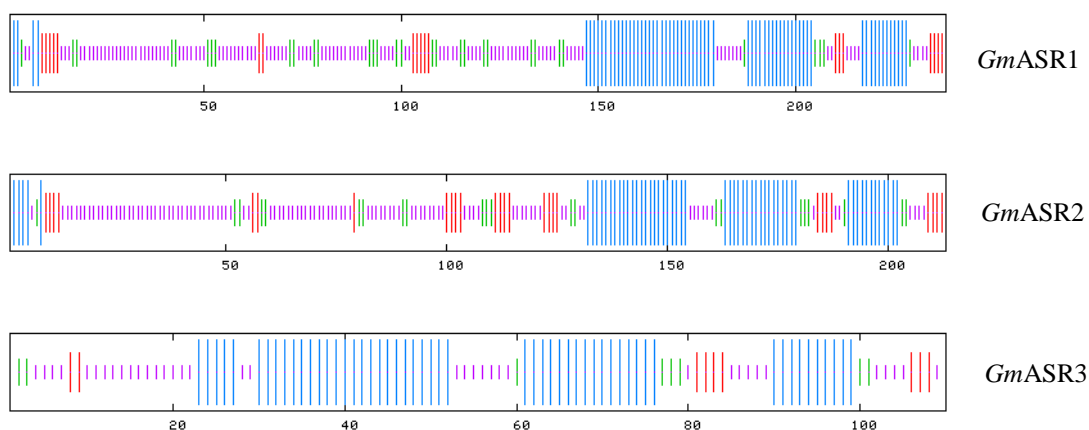
**Figura 6.** Alinhamento das seqüências de proteínas ASR de diferentes organismos: *Glycine max* (GmASR1, GmASR2 e GmASR3); *Medicago truncatula* (MtASR); *Lilium longiflorum* (LLA23); *Licopersicum esculentum* (LeASR1); *Zea mays* (ZmASR) e *Ginkgo biloba* (GbASR). Em preto seqüências 100% conservadas, cinza escuro 80% e cinza claro 60%. Destaque para as posições N-terminal e C-terminal das proteínas ASR de diferentes espécies.

A seqüência primária dos aminoácidos foi analisada utilizando o programa *FoldIndex* (<http://bioportal.weizmann.ac.il/fldbin/findex>). De acordo as predições deste modelo, as proteínas GmASR1, GmASR2 e GmASR3 são majoritariamente desordenadas (*unfolded*) sob condições fisiológicas normais (Figura 7).



**Figura 7.** Predição do enovelamento das proteínas ASR de soja via programa *FoldIndex*. Números positivos e negativos representam proteína ordenada (*folded*) e desordenada (*unfolded*), respectivamente. **A** = GmASR1; **B** = GmASR2; **C** = GmASR3.

A predição da estrutura secundária das proteínas foi conduzida com auxílio do *software* SOPMA *online* ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)). O resultado mostrou que GmASR1 possui 50% de zonas desordenadas, 28,57% de alfa hélice, 13,45% de ligações entre folhas beta e 7,98% de fita estendida. GmASR2 é composta por 49,30% de zonas desordenadas, 27,70% de alfa hélice, 12,68% de fita estendida e 10,33% de ligações entre folhas beta. GmASR3 possui a maior variação estrutural predita, sendo composta por 50,45% de alfa hélice, 33,33% de zonas desordenadas, 9,01% de fita estendida e 7,21% de ligações entre folhas beta (Figura 8).



**Figura 8.** Predição da estrutura secundária das proteínas ASR de soja. Os números indicam o aminoácido na sequência. As cores denotam os quatro padrões estruturais identificados: azul - alfa hélice; vermelho - fita estendida; verde - ligação entre folhas beta; roxo - zonas desordenadas.

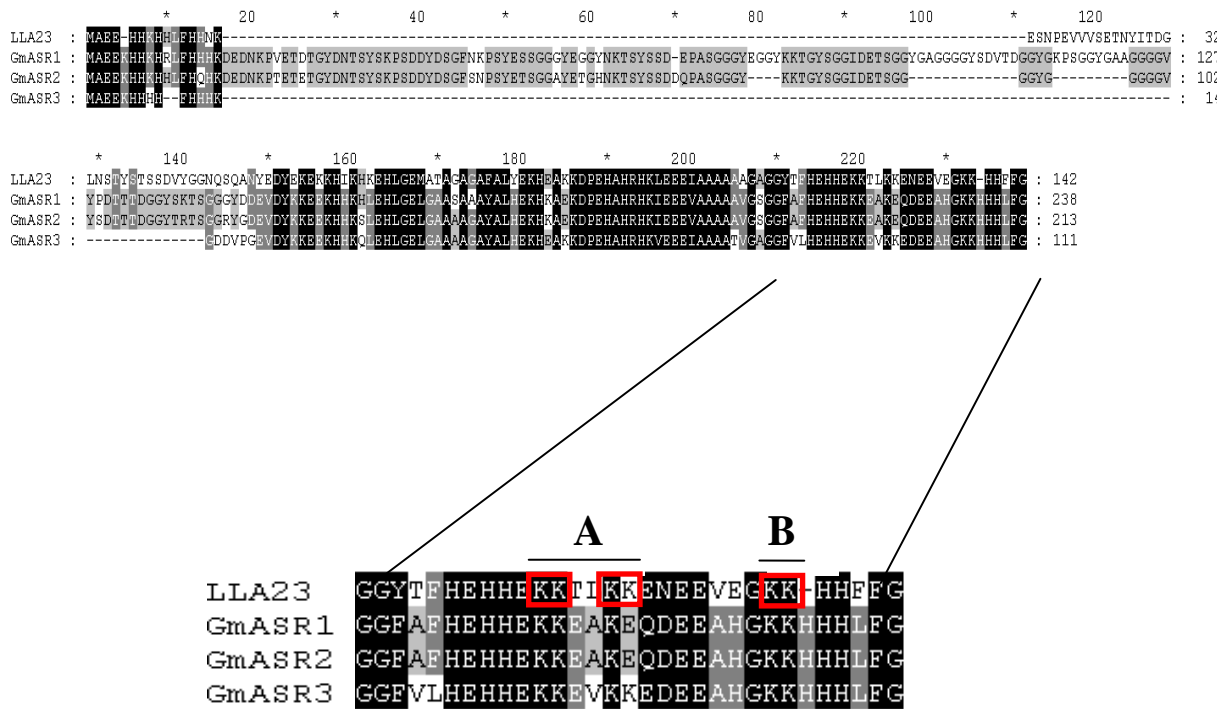
A estrutura de alfa hélice predomina na posição C-terminal das proteínas GmASR1 e GmASR2, excetuando uma pequena região na posição N-terminal. Resultado similar foi encontrado em tomate, onde a ASR1 da planta possui uma estrutura de dupla hélice repetida na porção C-terminal (MASKIN et al. 2001). Em GmASR3, que mantém somente as regiões N-terminal e C-terminal presentes em GmASR1 e GmASR2 (Figura 5), o padrão estrutural do tipo alfa hélice constitui parte majoritária da estrutura secundária na proteína.

Estes dados não estão em plena concordância com o modelo apresentado pelo programa utilizado anteriormente, no entanto ambos demonstram a presença significativa de zonas não ordenadas nas três proteínas estudadas.

Com o uso do *software* pI/Mw Tool ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) foram preditos o ponto isoelétrico (pI) e o peso molecular (Mw, do inglês *molecular weight*) das proteínas. GmASR1 possui o menor pI (5,65) e o maior Mw (25.86 kDa). GmASR2 possui valores intermediários de pI e Mw (respectivamente 5.77 e 23,56 kDa), enquanto o maior pI (6,42) e o menor Mw (13,12 kDa) foi verificado em GmASR3.

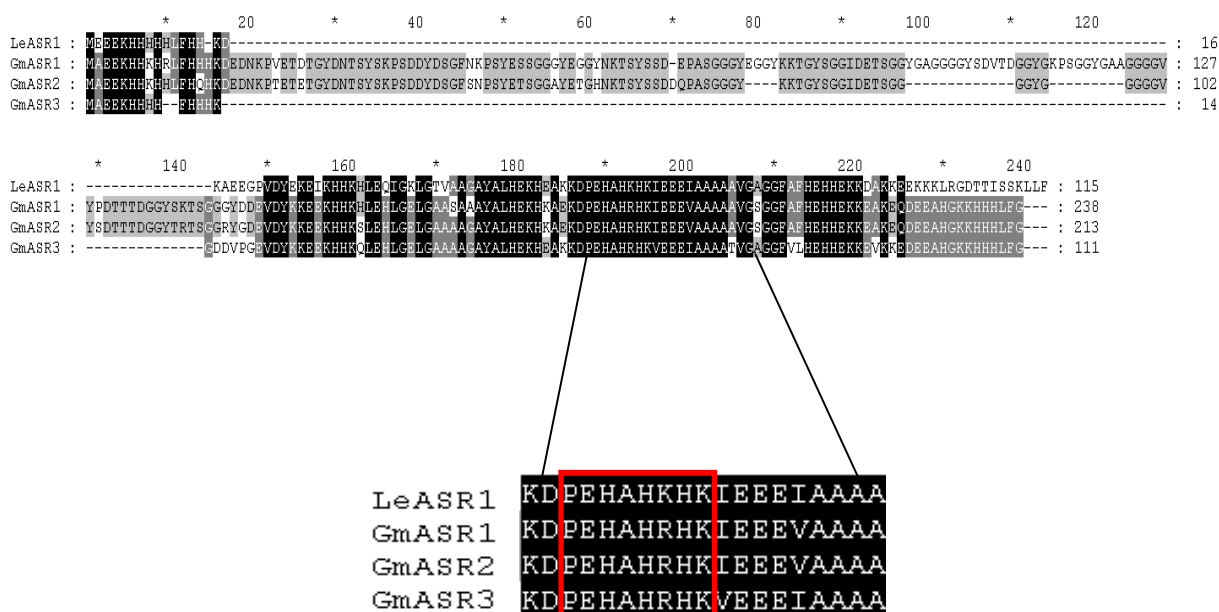
Resultados oriundos da análise de hidrofobicidade das proteínas ASR de soja (*software* ProtScal, <http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>) demonstraram que todas são predominantemente hidrofílicas, o que torna plausível supor que são solúveis e que podem estar localizadas no núcleo, como relatado em outras plantas, tais como pinheiro e lírio (PADMANABHAN et al., 1997; YANG et al. 2008).

Os sinais de localização nuclear possuem como característica a presença de resíduos do aminoácido básico lisina (K). Nas proteínas ASR este sinal se encontra na posição C-terminal e está relativamente bem conservado quando da comparação com os aminoácidos da proteína ASR de lírio – LLA23 (WANG et al., 2005). Como observado na Figura 9, estes resíduos estão separados em dois conjuntos representados pelas letras A e B, sendo que nos aminoácidos do conjunto A de GmASR1 e GmASR2 ocorreu a troca de um resíduo de lisina (K – aminoácido polar básico) por um resíduo de glutamato (E – aminoácido polar ácido).



**Figura 9.** Comparação do provável sinal de localização nuclear das proteínas ASR de soja com a proteína ASR de lírio – LLA23. Nos conjuntos destacados, representados pelas regiões A e B, estão salientados em vermelho os aminoácidos básicos do suposto sinal de localização nuclear.

Os resíduos envolvidos na atividade de ligação a DNA dependente de zinco foram preditos nas três proteínas ASR de soja. Para tanto, a sequência já identificada em tomate (LeASR1) por Rom e colaboradores (2006) foi utilizada como parâmetro na comparação. A análise demonstra que a região se apresenta totalmente conservada (Figura 10).



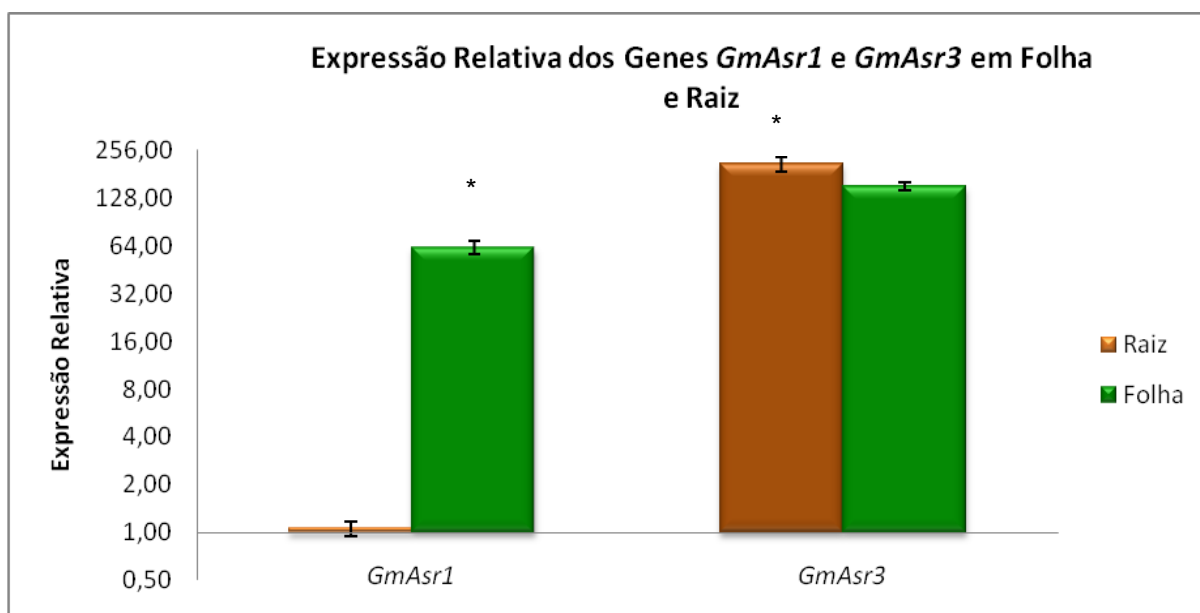
**Figura 10.** Comparação das proteínas ASR de soja com a proteína ASR de tomate (LeASR1). Em destaque, comparação dos prováveis resíduos envolvidos na atividade de ligação a DNA dependente de zinco das proteínas ASR de soja (GmASR1, GmASR2 e GmASR3) com a proteína ASR1 de tomate (LeASR1).

#### 4.2 PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES ASR DE SOJA

O presente trabalho avaliou o efeito de diversos agentes estressores na modulação da expressão de genes *Asr* em soja. A busca no genoma e no banco de *ESTs* da referida leguminosa possibilitaram a construção de *primers* específicos para as reações de RT-qPCR, cujos produtos foram confirmados por meio de sequenciamento. *GmAsr1*, *GmAsr2* e *GmAsr3* foram identificados tanto em cDNA quanto DNA genômico, no entanto, em virtude do baixo nível de expressão relativa e consequente difícil detecção nas condições experimentais avaliadas, o gene *GmAsr2* foi excluído das análises. Ressalta-se que dois pares de *primers* foram utilizados, mas ambos apresentaram resultados similares o que inviabilizou a inclusão deste gene nos experimentos testados.

Inicialmente, os níveis relativos de transcritos dos genes *GmAsr1* e *GmAsr3* de plantas cultivadas em condições controle foram mensurados. As análises demonstraram níveis mais elevados de transcritos de ambos os genes em folha. No entanto, o gene *GmAsr3* apresentou

maior quantidade relativa de transcritos, tanto em tecido foliar quanto radicular, sendo que neste último sua predominância é evidente quando comparado à *GmAsr1* (Figura 11).

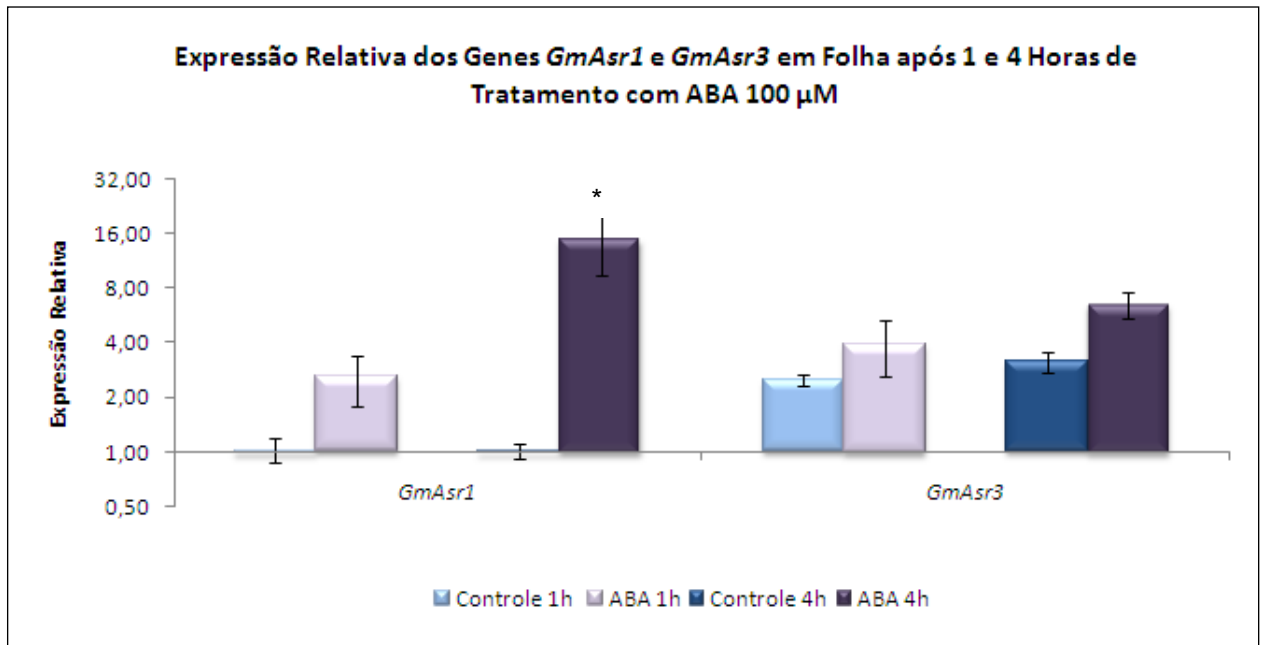


**Figura 11.** Nível de expressão dos genes *GmAsr1* e *GmAsr3* em raiz e folha de soja. A normalização dos resultados foi efetuada em relação à expressão do gene *GmAsr1* em tecido radicular. Asterisco indica diferença significativa.

#### 4.2.1 Análise da Expressão de Genes *Asr* em Resposta ao Fitormônio ABA

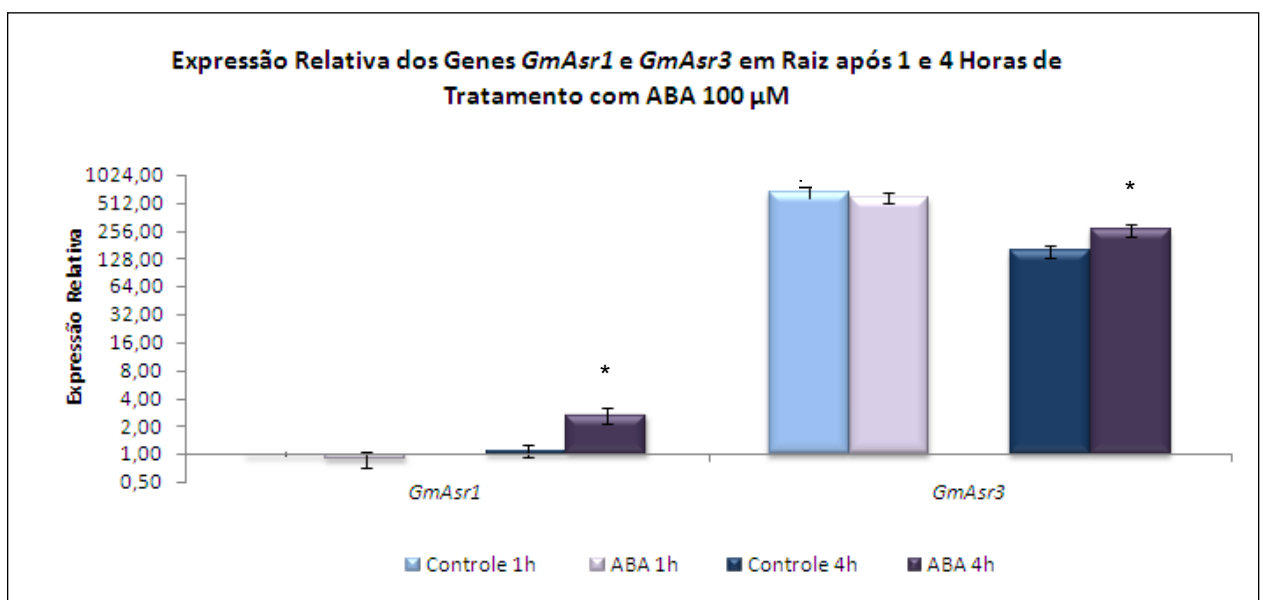
Plantas de soja foram submetidas ao tratamento com 100  $\mu$ M de ABA e amostras do tecido foliar e radicular foram coletadas nos tempos de 1 e 4 horas após o início da aplicação do fitormônio (ver item 3.2.1).

Nas análises em folha não houve diferença significativa no nível de transcritos dos genes *GmAsr1* e *GmAsr3* após 1 hora de contato com o agente estressor, enquanto no período de 4 horas somente o gene *GmAsr1* demonstrou indução (Figura 12).



**Figura 12.** Nível de expressão dos genes *GmAsr1* e *GmAsr3* em folha de soja em resposta ao tratamento com ABA 100  $\mu$ M. Os resultados foram normalizados em relação à expressão do gene *GmAsr1* em plantas controle. Asterisco indica diferença significativa.

Em raiz, o padrão de modulação observado foi diferente, ocorrendo aumento na expressão de ambos os genes após 4 horas de tratamento com ABA. Ressalta-se que neste experimento, o nível de transcritos do gene *GmAsr3* foi significativamente diferente nos controles em 1 e 4 horas e é decorrente de efeitos não relacionados à aplicação do fitormônio (Figura 13).

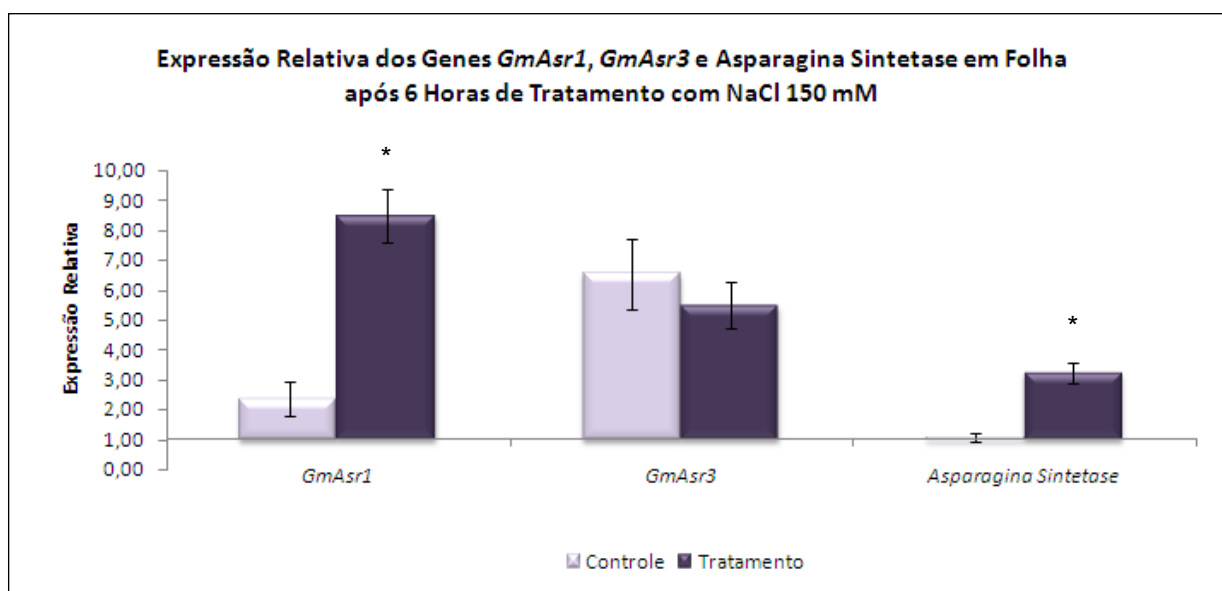


**Figura 13.** Nível de expressão dos genes *GmAsr1* e *GmAsr3* em raiz de soja em resposta ao tratamento com 100  $\mu$ M de ABA. Os resultados foram normalizados em relação à expressão do gene *GmAsr1* em plantas controle. Asterisco indica diferença significativa.

#### 4.2.2 Análise da Expressão de Genes *Asr* em Resposta a Sal

Plantas de soja submetidas ao tratamento com 150 mM de NaCl tiveram amostras do tecido foliar e radicular coletadas após 6 horas do início do experimento (ver item 3.2.2). Nas análises de RT-qPCR em tempo real foi utilizado como controle positivo o gene codificante da enzima asparagina sintetase (*GmAS*, ver item 3.8).

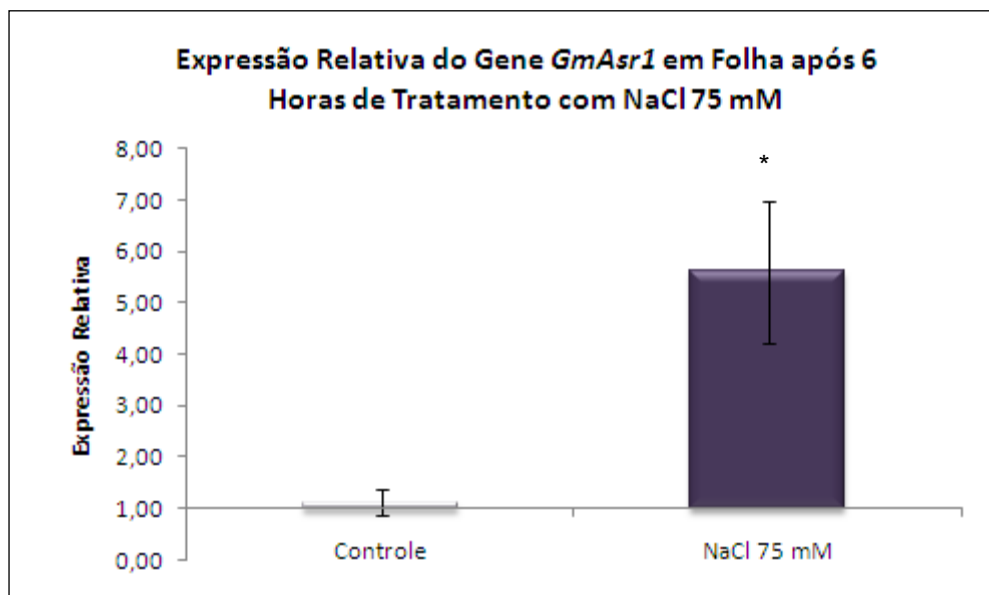
Os resultados obtidos evidenciaram uma elevação no nível de transcritos dos genes *GmAsr1* e *GmAS* em folha. Sob as mesmas condições, o gene *GmAsr3* não sofreu nenhuma alteração significativa (Figura 14). As diferenças entre os valores controle do gene *GmAsr3* verificadas nas figuras 11 e 14 são decorrentes de outros fatores que não a presença de sal no experimento.



**Figura 14.** Nível de expressão dos genes *GmAsr1*, *GmAsr3* e *AS* em folha de soja em resposta ao tratamento com 150 mM de NaCl. Os resultados foram normalizados em relação à expressão do gene *AS* em plantas controle. Asterisco indica diferença significativa.

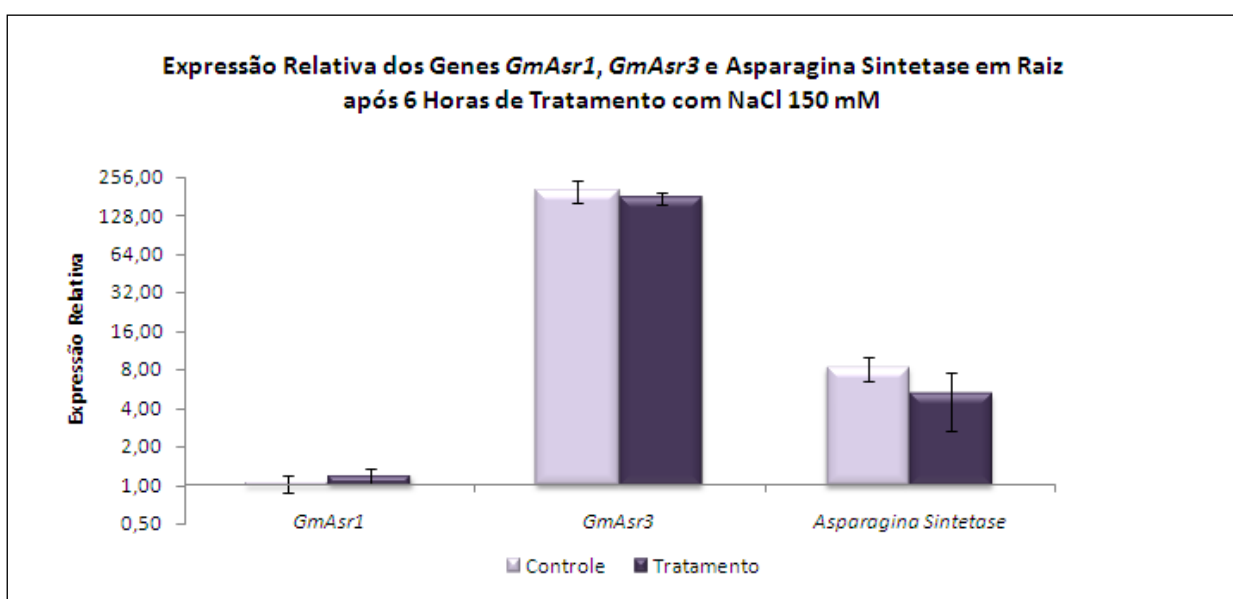
Outros experimentos também demonstram que o gene *GmAsr1* é responsivo ao estresse salino mesmo em menores concentrações de NaCl (Figura 15).





**Figura 15.** Nível de expressão do gene *GmAsr1* em folha de soja em resposta ao tratamento com 75 mM de NaCl. Os resultados foram normalizados em relação à expressão dos genes *F-box* e *Metaloprotease* em plantas controle. Asterisco indica diferença significativa.

Em tecido radicular, nenhuma modificação na expressão dos três genes foi constatada quando comparadas plantas controle e plantas submetidas ao estresse salino (Figura 16).

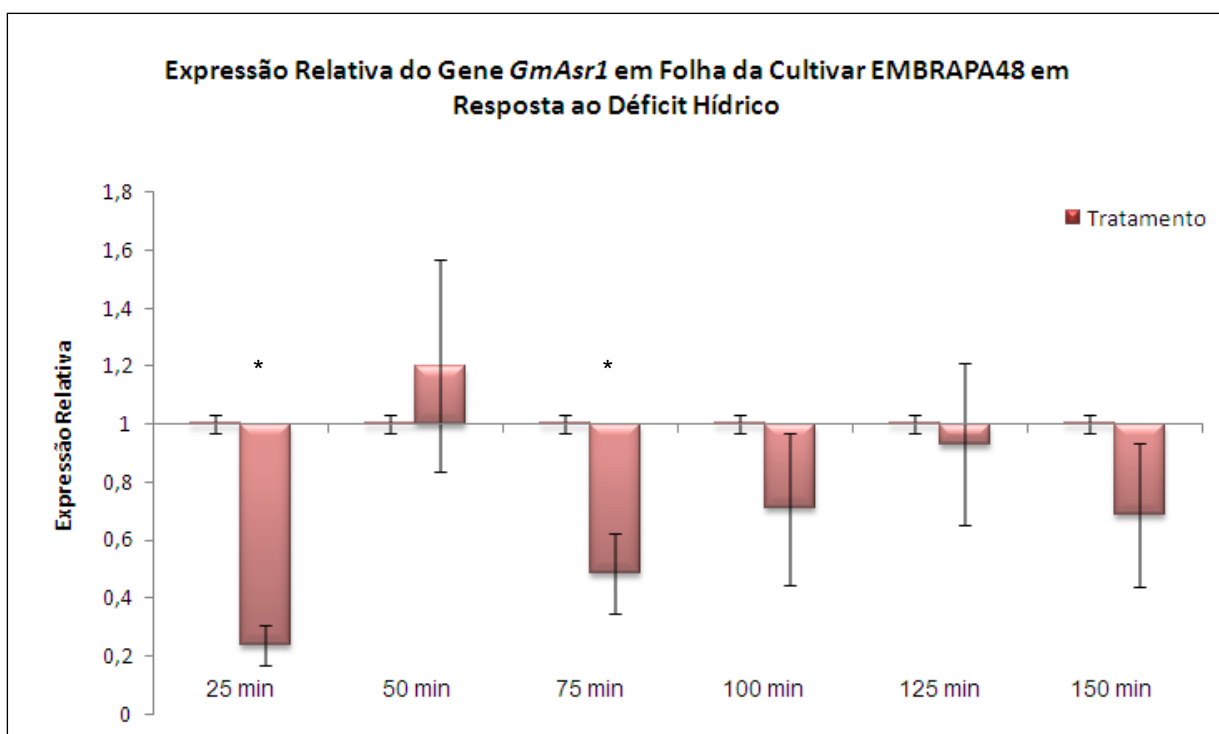


**Figura 16.** Nível de expressão dos genes *GmAsr1*, *GmAsr3* e AS em raiz de soja em resposta ao tratamento com 150 mM de NaCl. Os resultados foram normalizados em relação à expressão do gene *GmAsr1* em plantas controle.

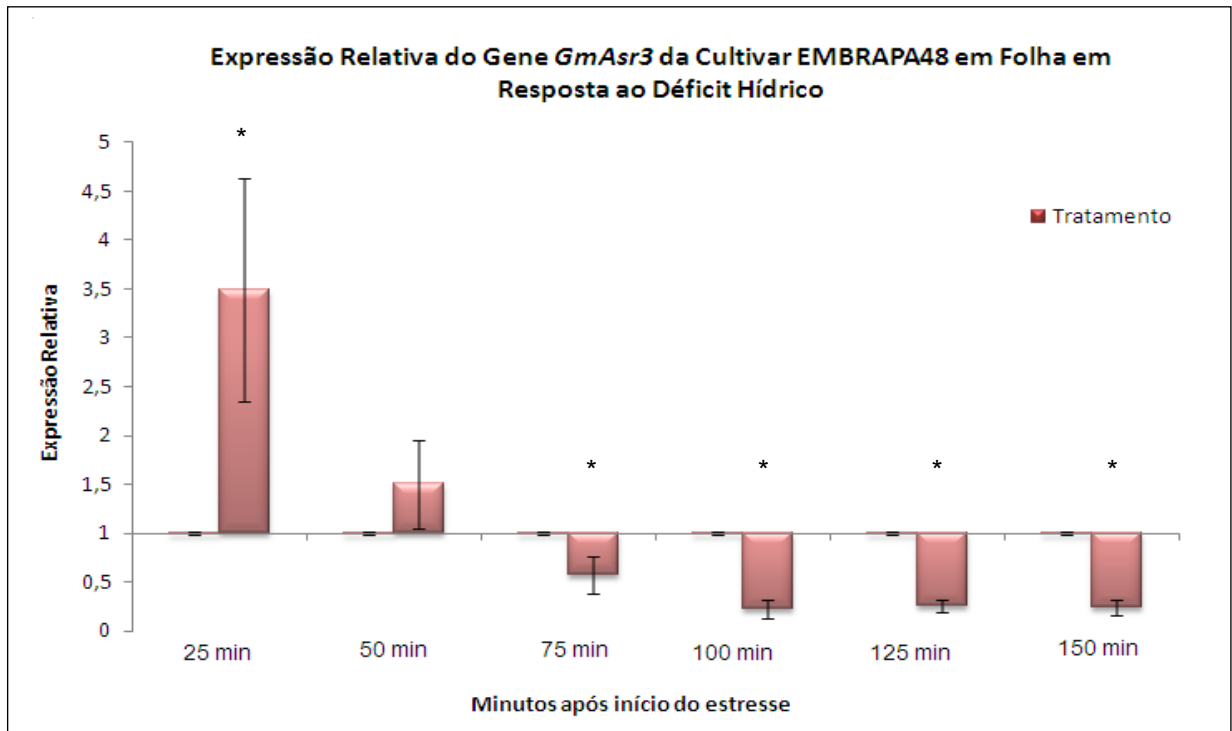
### 4.2.3 Análise da Expressão de Genes *Asr* em Resposta ao Déficit Hídrico

No experimento conduzido na EMBRAPA-SOJA, plantas da cultivar EMBRAPA-48 (tida como menos suscetível ao déficit hídrico), com três semanas de idade, foram retiradas de solução hidropônica e expostas ao ambiente. Amostras de folha foram coletadas nos tempos de 0, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 minutos (ver item 3.3).

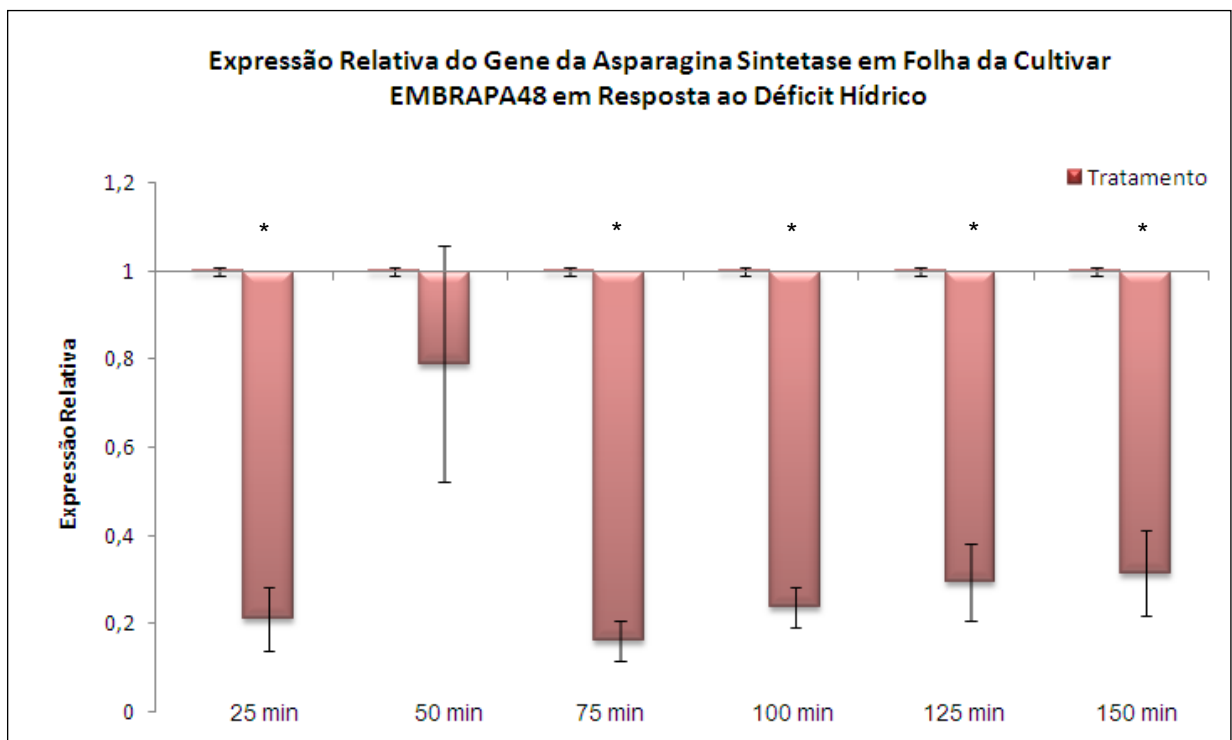
Os três genes analisados (*GmAsr1*, *GmAsr3* e *AS*) mostraram predominância de repressão de sua expressão nos períodos em que foram coletadas as folhas. Para *GmAsr1*, o nível de transcritos foi reduzido aos 25 e 75 minutos, sendo que nos demais momentos não se evidenciam alterações na modulação gênica (Figura 17). *GmAsr3* apresentou indução aos 25 minutos e repressão aos 100, 125 e 150 minutos. Nos períodos de 50 e 75 minutos não houve modificação na expressão (Figura 18). Excetuando o período de 50 minutos, o gene *AS* (controle positivo) foi severamente reprimido nos demais horários (Figura 19).



**Figura 17.** Nível de expressão do gene *GmAsr1* em folha de soja em resposta ao déficit hídrico. Os resultados foram normalizados em relação à expressão dos genes *F-Box* e *Metaloprotease* em plantas controle. Asterisco indica diferença significativa.

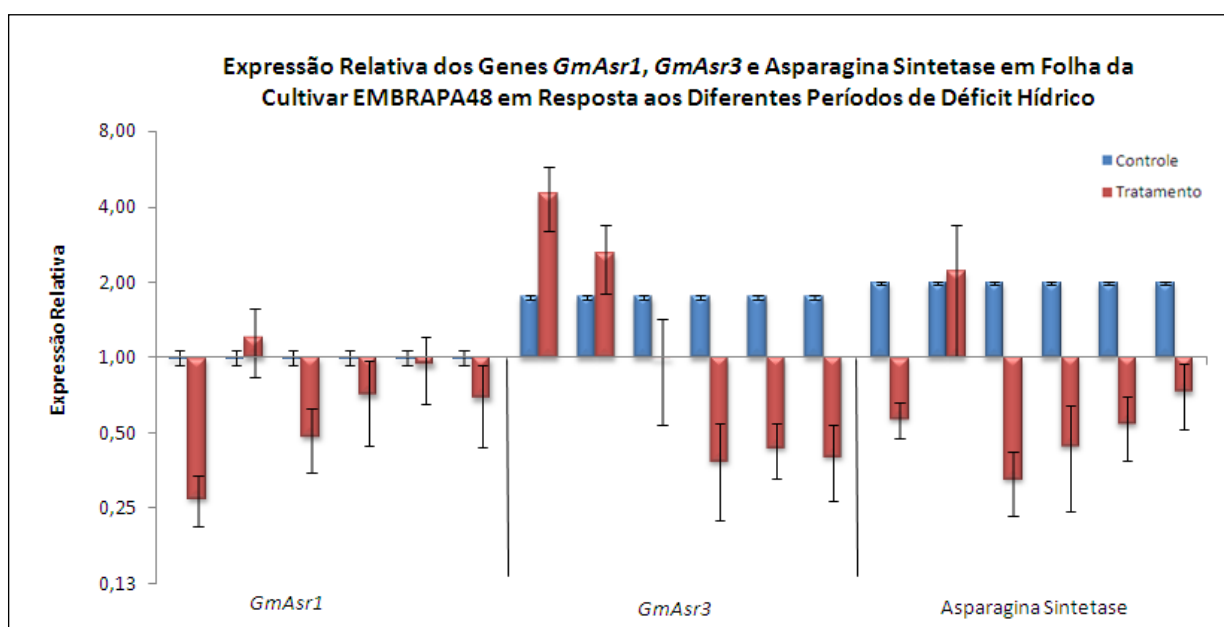


**Figura 18.** Nível de expressão do gene *GmAsr3* em folha de soja em resposta ao déficit hídrico. Os resultados foram normalizados em relação à expressão dos genes *F-Box* e *Metaloprotease* em plantas controle. Asterisco indica diferença significativa.



**Figura 19.** Nível de expressão do gene *AS* em folha de soja em resposta ao déficit hídrico. Os resultados foram normalizados em relação à expressão dos genes *F-Box* e *Metaloprotease* em plantas controle. Asterisco indica diferença significativa.

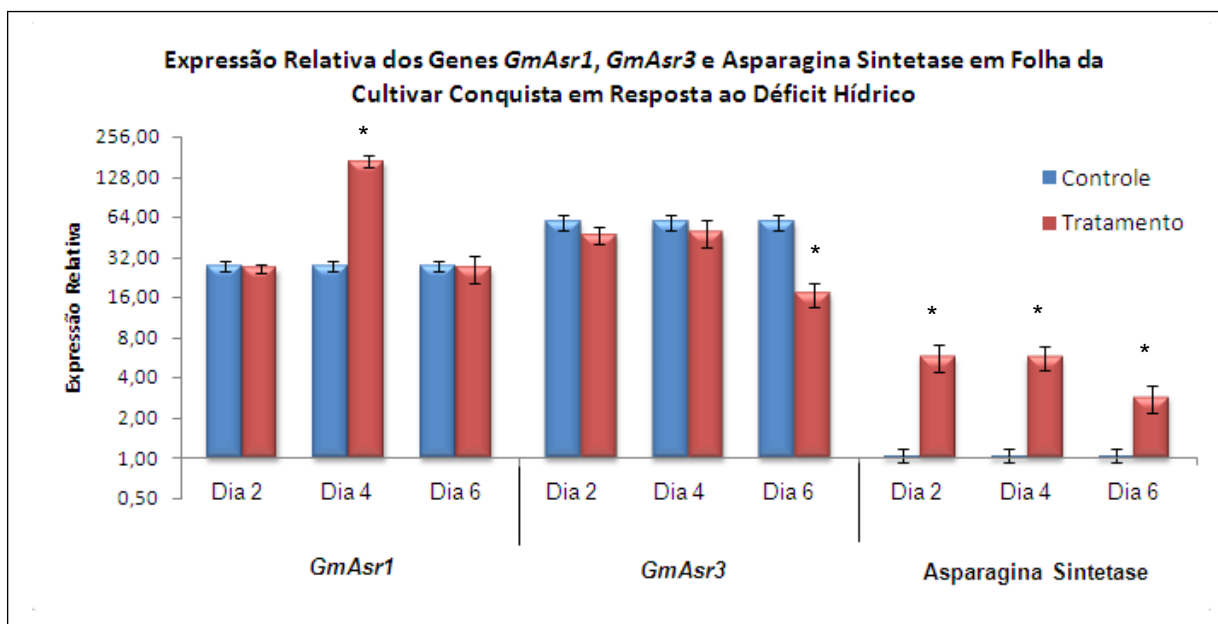
Quando agrupados em um mesmo gráfico (Figura 20) percebe-se que o gene *GmAsr1* foi o menos expresso e, por isso, utilizado para normalizar os demais. Tal situação contrasta com aquela observada nos experimentos com 150 mM de NaCl e de déficit hídrico (próximo item), onde o gene *AS* foi o menos expresso em folha.



**Figura 20.** Nível de expressão dos genes *GmAsr1*, *GmAsr3* e *AS* em folha de soja em resposta ao déficit hídrico. Os resultados foram normalizados em relação à expressão do gene *GmAsr1* em plantas controle.

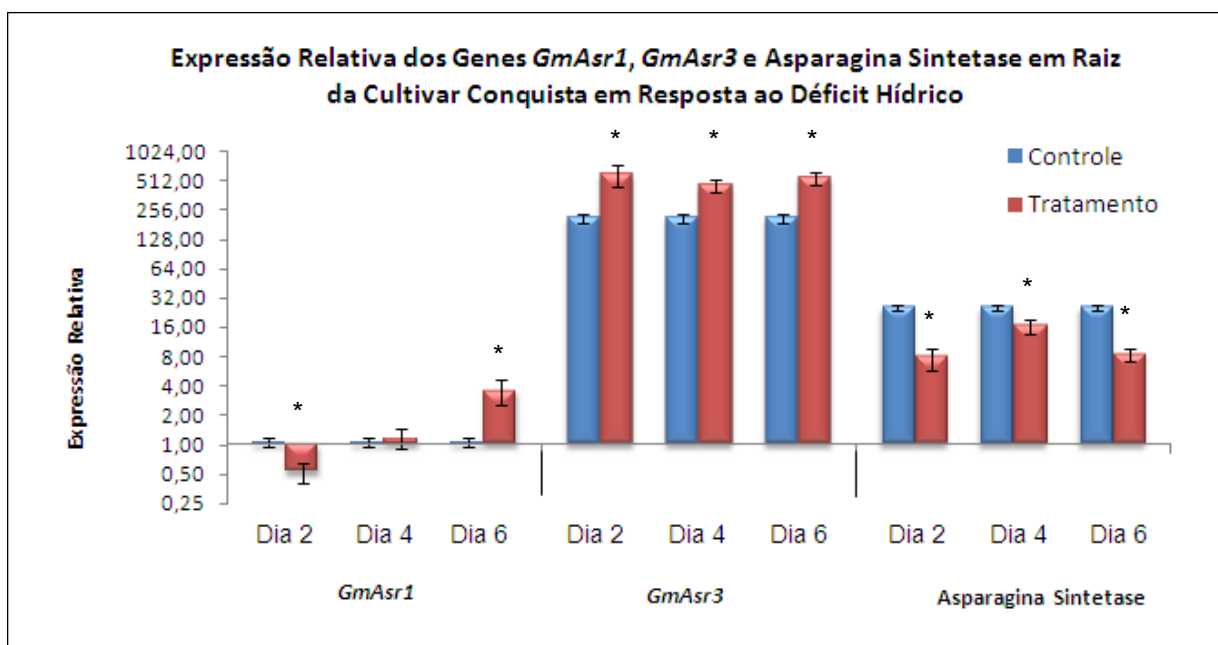
No experimento de déficit hídrico conduzido por nosso grupo (ver item 3.3), plantas da cultivar Conquista foram expostas a um período de seca, por meio da contenção de água. Amostras de raízes e folhas foram coletadas a cada dois dias após o início do tratamento.

O gráfico na Figura 21 demonstra claramente que os transcritos do gene *GmAsr1* possuem um pico de expressão durante o quarto dia de seca, retornando aos níveis basais no sexto dia. O nível de expressão do gene *GmAsr3* permaneceu inalterado nos segundo e quarto dias, reduzindo de forma consistente no sexto, quando comparado ao controle. Em todos os períodos do estudo, o gene da asparagina sintetase apresentou indução significativa, indicando que o tratamento aplicado foi efetivo.



**Figura 21.** Nível de expressão dos genes *GmAsr1*, *GmAsr3* e *AS* em folha de soja em resposta ao déficit hídrico. Os resultados foram normalizados em relação à expressão do gene *AS* em plantas controle. Asterisco indica diferença significativa.

Nas amostras coletadas de tecido radicular, o gene *GmAsr3*, além de mais expresso, teve os níveis de transcritos elevados durante o tratamento em todos os períodos. *GmAsr1* inicia com uma repressão no segundo dia e culmina com indução no sexto. Da mesma forma que o ocorrido no experimento com 150 mM de NaCl, o controle positivo (asparagina sintetase) não foi induzido (Figura 22).



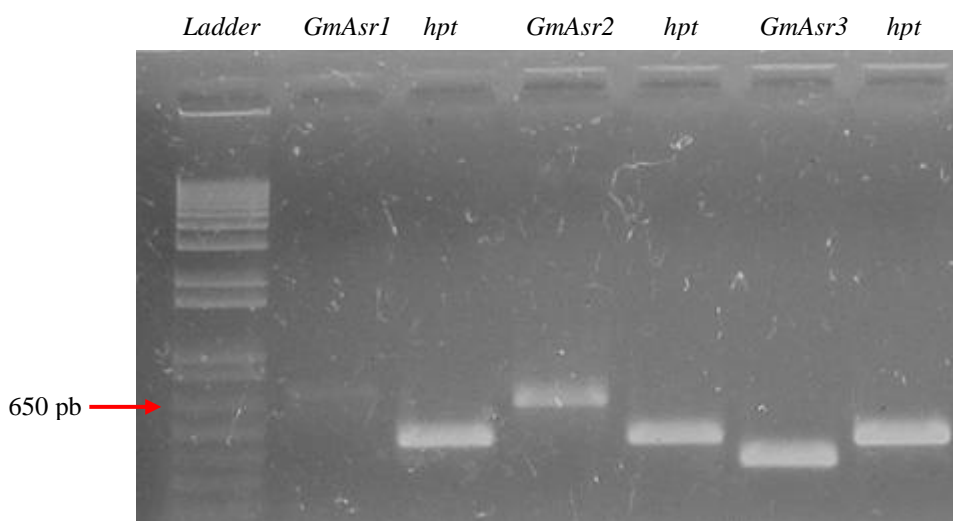
**Figura 22.** Nível de expressão dos genes *GmAsr1*, *GmAsr3* e Asparagina Sintetase em raiz de soja em resposta ao déficit hídrico. Os resultados foram normalizados em relação à expressão do gene *GmAsr1* em plantas controle. Asterisco indica diferença significativa.

#### 4.3 OBTENÇÃO DOS VETORES DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS PARA O ESTUDO DA SUPEREXPRESSION E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DAS PROTEÍNAS ASR DE SOJA

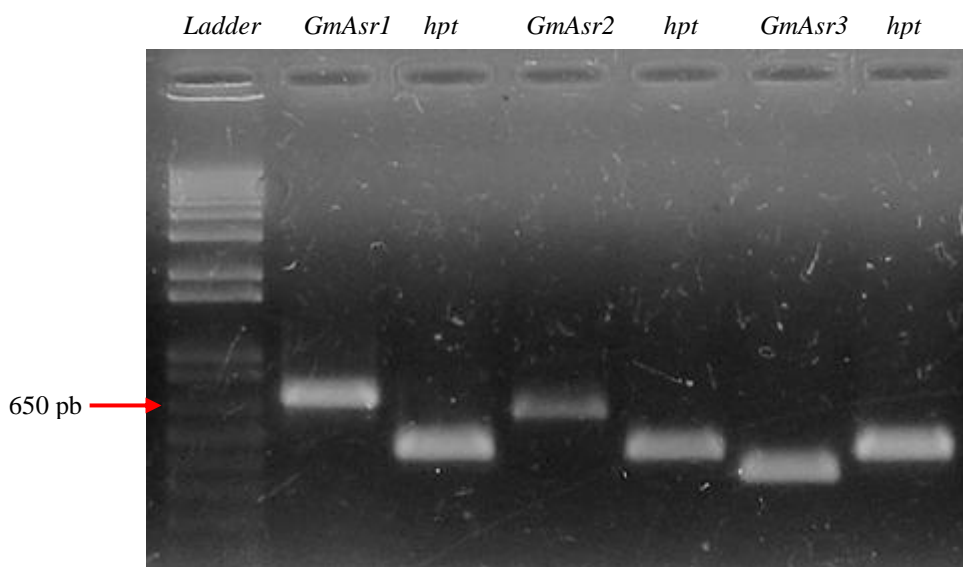
Tendo por objetivo a construção de vetores para superexpressão e localização subcelular das proteínas ASR, *primers* específicos foram projetados no intuito de amplificar a região codificante do cDNA dos genes *GmAsr1*, *GmAsr2* e *GmAsr3* (ver item 3.7).

Inicialmente, os cDNAs de interesse, extraídos de folhas de plantas de soja, foram clonados no vetor de entrada pENTR (Invitrogen), gerando diferentes produtos (pENTR*GmAsr1*, pENTR*GmAsr2* e pENTR*GmAsr3*). Bactérias *E. coli* (linhagem TOP10) eletrocompetentes foram transformadas e multiplicadas em meio de seleção do referido vetor contendo uma concentração de 50 µg ml<sup>-1</sup> do antibiótico canamicina. Após 24 horas foi realizada a extração dos plasmídeos (ver itens 3.9 e 3.10). A clonagem dos fragmentos correspondentes aos três genes foi confirmada por PCR e análise em eletroforese em gel de agarose 2%, bem como por posterior sequenciamento.

Em uma segunda etapa, os insertos foram transferidos para os vetores de destino pH7FWG2 e pH7WG2D (ver item 3.11). Ambos são vetores binários de T-DNA, sendo que o primeiro permite a fusão traducional da proteína de interesse na região N-terminal da proteína GFP (*Green fluorescent protein*), e, o segundo, possibilita a superexpressão das proteínas. Os vetores de entrada portando os genes *Asr* de soja foram recombinados com os vetores de destino, resultando em uma série de novas construções (pH7FWG2*GmAsr1*, pH7FWG2*GmAsr2* e pH7FWG2*GmAsr3* para localização subcelular e pH7WG2D *GmAsr1*, pH7WG2D *GmAsr2* e pH7WG2D *GmAsr3* para superexpressão). Os plasmídeos resultantes foram transferidos para bactérias *E. coli* (TOP10) eletrocompetentes, as quais foram multiplicadas em meio LB suplementado com o agente de seleção espectinomicina (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Novamente, as clonagens foram confirmadas por PCR e análise em eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando *primers* para os genes *GmAsr1*, *GmAsr2* e *GmAsr3* e para o gene *hpt*, presente no vetor de destino (Figuras 23 e 24).



**Figura 23.** Confirmação da clonagem de *GmAsr1*, *GmAsr2* e *GmAsr3* no plasmídeo pH7WG2D para o estudo de superexpressão das proteínas. Análise em eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da PCR, utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones contendo o cDNA de *GmAsr1* (717 pb), *GmAsr2* (642 pb) e *GmAsr3* (336 pb) extraídos de *E. coli*. A amplificação do gene *hpt*, presente no vetor, corresponde a uma banda de 400 pb. Marcador de peso molecular (*ladder*): 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen).



**Figura 24.** Confirmação da clonagem de *GmAsr1*, *GmAsr2* e *GmAsr3* no plasmídeo pH7FWG2 para o estudo de localização subcelular das proteínas. Análise em eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da PCR, utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones contendo o cDNA de *GmAsr1* (717 pb), *GmAsr2* (642 pb) e *GmAsr3* (336 pb) extraídos de *E. coli*. A amplificação do gene *hpt*, presente no vetor, corresponde a uma banda de 400 pb. Marcador de peso molecular (*ladder*): 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen).

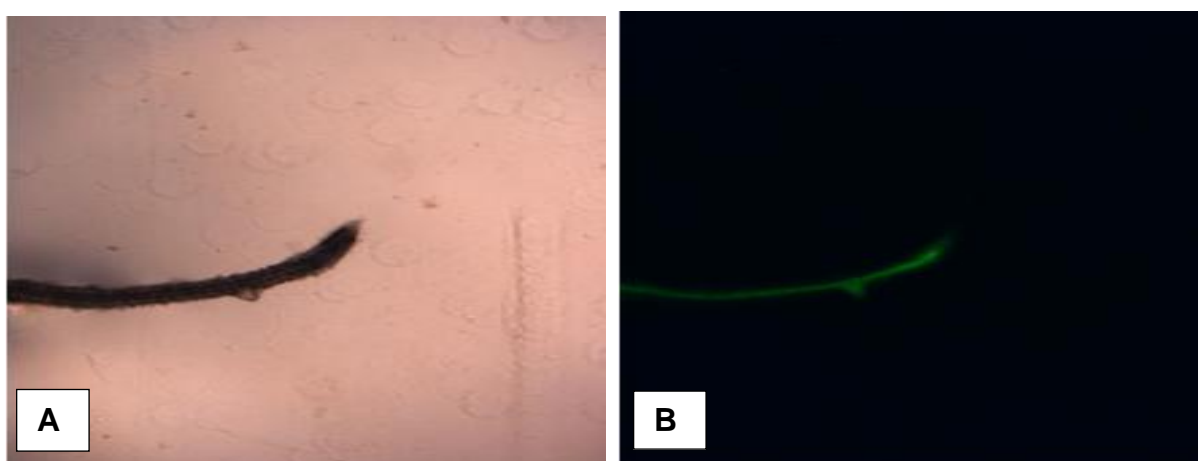
#### 4.4 TRANSFORMAÇÃO DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

Plantas de *A. thaliana* (ecotipo Columbia) nos estádios iniciais de florescimento foram aspergidas com inóculo contendo células transformadas de *A. tumefaciens* (linhagem LBA4404) portando os vetores de superexpressão e localização subcelular com os genes *Asr* de soja. Também foram transformadas plantas com os mesmos vetores, porém sem inserto de cDNA, para uso como controle nos experimentos (ver itens 3.12 e 3.13).

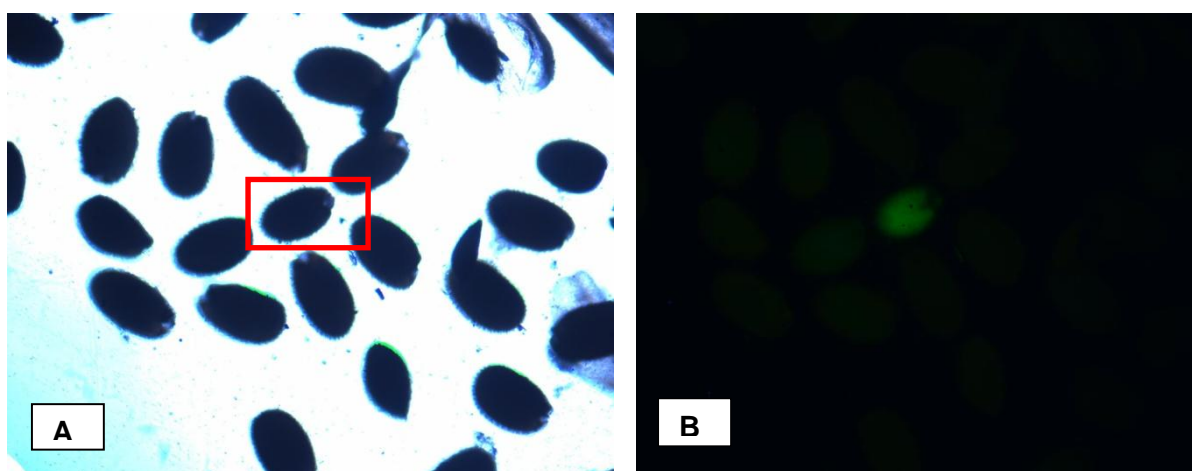
Inicialmente, todas as construções foram empregadas na aspersão floral de *A. thaliana*, porém, nenhuma planta sobreviveu ao processo. Em um segundo momento, os vetores de superexpressão foram novamente utilizados e, como ocorrido anteriormente, a transformação foi letal. Conjeturou-se que *A. tumefaciens* estivesse inviabilizando a obtenção de transgênicos e, com vistas a solucionar este entrave, novamente bactérias eletrocompetentes (de outro estoque) foram utilizadas para inserção das construções.



O terceiro evento de transformação, utilizando somente os vetores de localização subcelular (pH7FWG2*GmAsr1*, pH7FWG2*GmAsr2* e pH7FWG2*GmAsr3*), foi bem sucedido. Grande número de sementes foram obtidas nos experimentos realizados com as quatro construções. As sementes estão sendo analisadas para a identificação de transformantes. Resultados positivos já foram obtidos. Na Figura 25 pode ser observada a raiz de uma planta GFP+ (controle) e na Figura 26, semente de *A. thaliana* transformada com o gene *GmAsr1* fusionado ao gene codificante de uma proteína GFP.



**Figura 25.** Planta de *A. thaliana* transformada com o plasmídeo pH7FWG2. Em **A**, raiz sob luz branca e em **B**, sob comprimento de onda específico para visualização da proteína GFP (excitação – 488 nm; emissão – 505-530 nm).



**Figura 26.** Sementes de *A. thaliana* transformadas com o plasmídeo pH7FWG2*GmAsr1*. Em **A**, sementes sob luz branca e em **B**, sob comprimento de onda específico para visualização da proteína GFP (excitação – 488 nm; emissão – 505-530 nm). A semente transformada está destacada no quadro vermelho em **A**.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISES *IN SILICO*

A poliploidia teve um profundo efeito na estruturação do genoma da soja ( $n=20$ ), fato constatado pela notável extensão na qual blocos de genes duplicados ainda permanecem retidos e ativos do ponto de vista transcricional e traducional. Estudos apontam que as duplicações ocorreram a aproximadamente 59 e 13 milhões de anos, resultando em um genoma com aproximadamente 75% dos genes presentes em múltiplas cópias. Estes eventos foram seguidos pela diversificação e perda gênica, assim como por numerosos rearranjos de cromossomos (SCHMUTZ, et al. 2010).

Zhu e colaboradores (1994) estimaram que aproximadamente um quarto dos genes duplicados foram perdidos do genoma da soja desde o último evento de poliploidização. Através da análise de *ESTs* da cultivar Williams 82, Shoemaker e colaboradores (2006) indicaram que, em média, cada família gênica é composta por 3,1 cópias. O número é menor do que seria esperado se todas as cópias dos dois eventos de total duplicação permanecessem retidas e expressas.

A presença de três genes *Asr* em soja evidencia a história evolutiva da leguminosa. É tentador imaginar que a homologia entre as sequências de *GmAsr1* e *GmAsr2* decorra de um evento de duplicação, enquanto a única cópia do gene *GmAsr3* seja consequência do outro evento, com posterior perda de seu parálogo. No entanto, somente estudos filogenéticos aprofundados permitirão determinar a história da família *Asr* no contexto evolutivo do genoma da planta (uma reconstrução filogenética da família de genes *Asr* de soja está inclusa no anexo 2).

Apesar da extensa região de deleções presente em GmASR3, a proteína mantém conservados os domínios N-terminal e C-terminal, também presentes em GmASR1 e GmASR2. Isto é de suma importância, uma vez que estudos de atividade de ligação a DNA e MALDI-TOF-MS, realizados por Slava e colaboradores (2006), sugerem que a proteína ASR1 de tomate se ligue a pelo menos três íons de zinco, sendo dois no domínio amino-terminal e, pelo menos um, no domínio de ligação a DNA (carboxi-terminal).

Caracteristicamente, as proteínas ASR não possuem resíduos de cisteína, normalmente presentes em moléculas dedo de zinco (cujos estudos são os mais extensos e detalhados). Estas proteínas também carecem de outros motivos de ligação a metal conhecidos. Sendo assim, nem o número nem a localização dos sítios de ligação a zinco podem ser preditos nas proteínas ASR de soja através da comparação com estruturas já conhecidas. No entanto, sabe-se que o zinco catalítico geralmente forma complexos com resíduos de His (histidina), Glu (glutamato), Asp (aspartato) e Cys (cisteína), sendo histidina o aminoácido predominantemente escolhido (AULD, 2001). A cristalografia solucionária pormenores relacionados à estrutura da proteína. No entanto, a técnica parece ser extremamente complexa, como demonstrado por Goldgur e colaboradores (2007), que testaram mais de 600 condições para cristalizar a proteína LeASR1 de *Lycopersicon esculentum* purificada e não obtiveram êxito. Uma alternativa para determinar a estrutura tridimensional da proteína seria o emprego da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), uma vez que a técnica é reconhecidamente a mais importante para a investigação a nível molecular, permitindo obter importantes informações acerca da estrutura e dinâmica das proteínas ASR de soja.

Romero e colaboradores (2001) registraram que proteínas desordenadas são relativamente enriquecidas em aminoácidos promovedores de desordem (*disorder-promoting*; E, K, R, G, Q, S, P e A) e empobrecidas em resíduos que promovam ordem (*order-promoting*; I, L, V, W, F, Y e C). Cinco resíduos de aminoácidos preponderam em todas as sequências das

proteínas ASR de soja (Ala, Gli, Glu, His e Lis), sendo que três deles (Ala, Lis e Glu) são promovedores de desordem e um (His) é neutro. Nas proteínas também estão ausentes os resíduos de cisteína (Cis) e triptofano (Trp), definidos como promovedores de ordem. Os resultados obtidos com o programa *FoldIndex* condizem com as informações supracitadas (Figura 6), demonstrando que as proteínas ASR de soja são intrinsecamente desestruturadas.

Através da análise do padrão estrutural secundário utilizando um modelo alternativo pode-se atentar para o predomínio de elementos do tipo alfa hélice na região C-terminal de *GmASR1* e *GmASR2* e em mais da metade da extensão de *GmASR3* (Figura 8). Embora estes dados não estejam em concordância com o demonstrado anteriormente, a presença de zonas desordenadas é peculiar as proteínas ASR, fato constatado pelos dois programas. Estudos utilizando espectroscopia de RNM fornecerão dados mais consistentes com relação à estrutura tridimensional das proteínas ASR.

Análises de espectroscopia na região do infravermelho com transformação de *Fourier* (FTIR, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) sugerem que na presença de  $Zn^{+2}$ , ASR1 de tomate ganhe mais domínios de alfa hélice e folhas beta, os quais conduzem a uma estrutura polipeptídica mais ordenada (GOLDGUR et al., 2007). Em virtude das características apresentadas, provavelmente as proteínas ASR de soja também respondam da mesma maneira quando em contato com a molécula do metal.

À semelhança da ASR de lírio, as proteínas ASR de soja mantêm conservados os domínios A e B do suposto sinal de localização subcelular (Figura 8). Como já citado, a única modificação se encontra em *GmASR1* e *GmASR2*, nas quais o quarto resíduo de lisina (aminoácido polar básico) do conjunto A foi substituído por um resíduo de glutamato (aminoácido polar ácido). Wang e colaboradores (2005) demonstraram que o conjunto A é mais importante na determinação da localização nuclear da proteína ASR de lírio quando comparado ao conjunto B. Além disso, confirmaram que a substituição dos dois primeiros

resíduos de lisina por alanina representa a mutação que afeta mais severamente o translado da proteína ao núcleo. Do exposto, infere-se que a funcionalidade do referido sinal provavelmente se mantém ativa nas proteínas ASR de soja.

No entanto, é preciso ressaltar que membros de uma mesma família gênica podem ter papéis diferentes em compartimentos celulares distintos e que a presença do sinal de localização nuclear não é o único fator determinante para o direcionamento das proteínas, embora desempenhe uma função considerável no processo (WANG et al., 2005).

Por fim, a análise dos resíduos envolvidos na atividade de ligação a DNA dependente de zinco foi predita nas três proteínas ASR de soja, com base na sequência já identificada em tomate e se mostrou totalmente conservada, evidenciando a potencial ligação do metal a estes resíduos de aminoácidos nas proteínas da leguminosa (Figura 10).

## 5.2 EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES ASR DE SOJA

A análise da quantidade relativa de transcritos dos genes *Asr*, tanto em folha quanto em raiz, permitiu determinar a predominância do gene *GmAsr3* em ambos os tecidos, muito embora deva-se destacar que a expressão do gene *GmAsr1* em folha é significativamente maior que sua expressão em raiz (Figura 11). Maskin e colaboradores (2001) reportaram a expressão diferencial de três membros da família gênica *Asr* em folha e raiz de tomate, onde também se observa diferença no nível basal de transcritos no mesmo tecido.

A indução de genes *Asr* por ABA já foi relatada em tomate (AMITAI-ZEIGERSON et al., 1995), pinheiro (PADMANABHAN et al., 1997), arroz (VAIDYANATHAN et al., 1999), cana-de-açúcar (SUGIHARTO et al., 2002) e videira (ÇAKIR et al.; 2003). No entanto, enquanto a maioria dos genes ASR parece ser regulada por ABA, a expressão do ortólogo *DS2* em batata é independente do fitormônio (DÓCZI et al., 2002). Em soja, o gene *GmAsr1* foi

expresso em folha após 4 horas de tratamento com esse hormônio (Figura 12) e, em raiz, tanto o gene *GmAsr1* quanto *GmAsr3* tiveram os níveis relativos de transcritos aumentados após 4 horas de contato com o agente estressor (Figura 13). Estes resultados indicam que ambos os genes respondem aos estímulos do referido hormônio vegetal.

Os experimentos com sal (Figuras 14 e 15) validaram a indução preferencial de *GmAsr1* em folha após 6 horas de tratamento, tanto na concentração de 150 (extremamente agressiva) quanto 75 mM (Figuras 14 e 15). Amitai-Zeigerson e colaboradores (1995), Schneider e colaboradores (1997) e Vaidyanathan e colaboradores (1997) também caracterizaram a indução de genes *Asr* em resposta ao estresse salino.

No experimento de seca realizado na EMBRAPA-SOJA, a característica marcante foi a repressão verificada nos genes *GmAsr1* (Figura 17), *GmAsr3* (Figura 18) e, principalmente, no controle *AS* (Figura 19). Quando dispostos em um mesmo gráfico (Figura 20) a expressão relativa dos transcritos foi normalizada com *GmAsr1*, fato que contrasta com os resultados obtidos nos experimentos anteriores, onde *AS* demonstrara ser o gene menos expresso em folha. É possível que a discrepância observada seja decorrente da severidade do tratamento aplicado ou que outros fatores (como, por exemplo, o uso de diferentes cultivares) e não somente o déficit hídrico estejam influenciando na modulação do perfil de expressão dos genes *Asr* de soja nestas circunstâncias experimentais.

Com base no exposto, acreditamos que o modelo experimental adotado por nosso grupo de pesquisa forneça uma maior aproximação da real condição fisiológica das plantas em ambiente não controlado sob estresse por déficit hídrico. Os resultados observados condizem com nossas previsões, com *GmAsr1* aumentando o nível de transcritos de forma transiente em folha (Figura 21) e *GmAsr3* apresentando repressão no nível de transcritos a partir do sexto dia. Ressalta-se que a expressão transiente observada em ambos os genes é uma característica marcante da família *Asr* (AMITAI-ZEIGERSON et al. 1995). Embora uma

indução significativa do gene *GmAsr1* também tenha sido observada em raiz no sexto dia de tratamento, é evidente a expressão preferencial de transcritos do gene *GmAsr3* em tecido radicular, os quais se mantiveram altamente expressos durante todo o período avaliado. O gene codificante da enzima asparagina sintetase (AS) apresentou repressão no nível de transcritos em raiz, fato que demonstra que ele pode ser utilizado como controle positivo eficiente para verificar a expressão somente em folha (Figura 22). Este fato está de acordo com o observado no experimento com sal em raiz, no qual o gene AS também não apresentou indução no nível de transcritos após 6 horas de tratamento (Figura 16).

Desde a identificação e caracterização do primeiro gene *Asr* em planta (IUSEM et al., 1993), a responsividade da família ao déficit hídrico tem sido demonstrada em alguns estudos e sua importância atribuída, até mesmo, à adaptação evolutiva de espécies do gênero *Lycopersicon* em habitats áridos (FRANKEL et al., 2003). A expressão significativa de *GmAsr1* e *GmAsr3* sob este estresse indica que a modulação nos transcritos desses genes está possivelmente atrelada à resposta decorrente da escassez de água.

As informações adquiridas permitem estabelecer um distinto padrão de indução preferencial de *GmAsr1* em folha em resposta a ABA, sal e seca, e *GmAsr3* em raiz em resposta a ABA e seca. Schneider e colaboradores (1997) e Rossi e colaboradores (1998) evidenciaram a importância do estudo dos promotores dos genes *Asr* quando de estresses por sal, ABA e déficit hídrico. A busca por elementos na região promotora que pudessem vir a explicar a especificidade de tecido não revelou nenhum indício (*PlantCARE* - <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), uma vez que ambos os genes compartilham exatamente os mesmos *cis* elementos, localizados 2 kb a montante do códon de início da tradução (dados não mostrados).

### 5.3 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR E SUPEREXPRESSION DAS PROTEÍNAS ASR DE SOJA

Chandra e Pental (2003) ressaltam que as baixas taxas de transformação e regeneração, bem como a frequente obtenção de plantas quiméricas, são elementos limitantes no processo de obtenção de transgênicos de soja. Da mesma forma, trabalhos do nosso grupo já demonstraram, diversas vezes, que são inúmeras as dificuldades para a obtenção de plantas de soja estavelmente transformadas. Por estes motivos, genes candidatos à transformação de soja (ou outra planta de interesse qualquer) podem ser mais rapidamente avaliados com relação às suas capacidades em aumentar a tolerância aos estresses em *A. thaliana*, antes de prosseguir com sua introdução na referida leguminosa (MANAVALAN et al., 2009).

Apesar de entraves iniciais, a obtenção de *A. thaliana* (Figuras 25 e 26) portando as construções que permitirão determinar a localização subcelular das proteínas ASR de soja, foi bem sucedida. Está é a primeira vez que uma proteína ASR fusionada a uma GFP é integrada estavelmente em planta. As linhagens recuperadas no processo de transformação serão submetidas a diferentes estresses abióticos e o possível deslocamento da proteína (citoplasma – núcleo) poderá ser avaliado antes e após o estabelecimento de situações adversas.

O potencial agrônomo na utilização de genes *Asr* visando o melhoramento genético tem sido demonstrado em alguns trabalhos. Em tabaco, a superexpressão do gene *Asr1* de tomate resultou em maior tolerância a sal (KALIFA et al. 2004b). Em *A. thaliana* plantas transgênicas superexpressando o gene ortólogo de lírio *lla23* aumentaram a tolerância à seca e salinidade (YANG et al., 2005). Novos eventos de transformação na planta modelo, com os vetores portando os insertos para superexpressão dos genes *Asr* de soja, permitirão determinar o papel que as proteínas desempenham na resposta ao estresse.



Por fim, deve-se ressaltar que apesar do promissor emprego destes genes em estudos de genômica funcional, até o presente momento o trabalho aqui exposto é o primeiro registro abordando a família de genes *Asr* de soja.

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No presente trabalho foi identificada a família *Asr* de soja, composta por três membros (*GmAsr1*, *GmAsr2* e *GmAsr3*), bem como avaliada a expressão relativa dos genes *GmAsr1* e *GmAsr3* em resposta a ABA, NaCl, seca e ferrugem asiática (anexo 3), sendo o primeiro preferencialmente induzido em folha e o segundo em raiz. Além disso, foram construídos vetores binários de transformação de plantas visando estudos funcionais destes genes.

Sementes de *A. thaliana* transformadas com as proteínas de interesse fusionadas a GFP estão em processo de seleção e sua avaliação permitirá determinar a localização subcelular de todos os membros da família *Asr* de soja.

Os vetores de superexpressão (já construídos) e silenciamento (a ser construído) serão utilizados em futuros trabalhos de genômica funcional, nos quais o foco dos experimentos será a transformação da própria leguminosa, com vistas a determinar a resposta das plantas transgênicas a diferentes estresses ambientais.

Também seria de grande interesse estabelecer quais são os genes alvo de ativação das proteínas *Asr* em soja (por exemplo, com uso de microarranjo em plantas transgênicas com as proteínas superexpressas ou silenciadas), uma vez que estas informações lançarão novas perspectivas em relação à via de indução de respostas da planta a estímulos estressores externos.

## BIBLIOGRAFIA

ABDELNOOR, R. V.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree data. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, n. 2, p. 265-273, 1995.

AULD, D. S. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. **BioMetals**, v. 14, n. 3-4, p. 271-313, Set. 2001.

AMITAI-ZEIGERSON, H.; SCOLNIK, P. A.; BAR-ZVI, D. Tomato *Asr1* mRNA protein are transiently expressed following salt stress, osmotic stress and treatment with abscisic acid. **Plant Science**, v. 10, n. 2, p. 205-213. Sep. 1995.

ASSELBERGH, B.; VLEESSCHAUWER, D.; HÖFTE, M. Global Switches and Fine Tuning - ABA Modulates Plant Pathogen Defense. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 21, n. 6, p. 709-719. Fev. 2008.

BAJGUZ, A. e HAYAT, S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 1-8, Out. 2008.

BARTELS, D. e SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, p. 23-58, 2005.

BRAY, E. A. Molecular Responses to Water Deficit. **Plant Physiology**, v. 103, n. 4, p. 1035-1040, Dez. 1993.

BODANESE-ZANETTINI, M. H.; LAUXEN, M. S.; RICHTER, S. N. C.; CAVALLI-MOLINA, S.; et al. Wide hybridization between Brazilian soybean cultivars and wild perennial relatives. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, n. 5-6, p. 703-709, Out. 1996.

ÇAKIR, B.; AGASSE, A.; GAILLARD, C. SAUMONNEAU, A.; DELROT, S.; ATANASSOVA, R. A Grape ASR Protein Involved in Sugar and Abscisic Acid Signaling. **The Plant Cell**, v. 15, n. 9, p. 2165-2180, Sep. 2003.

CAKMAK, I. Plant nutrition research: Priorities to meet human needs for food in sustainable ways. **Plant and Soil**, v. 247, n. 1, p. 3-24, Nov. 2002.

CANEL, C.; BAILEY-SERRES, J. N.; ROOSE, M. L. Pummelo fruit transcript homologous to ripening-induced genes. **Plant Physiology**, v. 108, n. 3, p. 1323-1324, Jul. 1995.

CARRARI, F.; FERNIE, A. R.; IUSEM, N. D. Heard it through the grapevine? ABA and sugar cross-talk: the ASR story. **TRENDS in Plant Science**, v. 9, n. 2, p. 57-59, Fev 2004.

CHANDRA A. e PENTAL D. Regeneration and genetic transformation os grain legumes: An overview. **Current Science**, v. 84, n. 3, p. 381-397, Fev. 2003.

CHANG, S.; PURYER, J. D.; DIAS, M. A. D. L.; FUNKHOUSER, E. A. Gene expression under water deficit in loblolly pine (*Pinus taeda*): Isolation and characterization of cDNA clones. **Physiologia Plantarum**, v. 97, n. 1, p. 139-148, Maio 1996.

CHEN, M.; WANG, Q. Y.; CHENG, X. G.; XU, Z. S.; et al. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, n. 2, p. 299-305, Fev. 2006.

CHENG, L.; HUAN, S.; SHENG, Y.; HUA, X.; et al. GMCHI, cloned from soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] enhances survival in transgenic *Arabidopsis* under abiotic stress. **Plant Cell Reports**, v. 28, n. 1, 145-153, Jan. 2008.

DE RONDE, J. A.; CRESSC, W. A.; KRUGER, G. H. J.; STRASSERD, R. J.; STADEN, J. V. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 11, Jan. 2004a.

DE RONDE, J. A.; LAURIE, R. N.; CAETANO, T.; GREYLING, M. M.; KEREPESEI, I. Comparative study between transgenic and non-transgenic soybean lines proved transgenic lines to be more drought tolerant. **Euphytica**, v. 138, n. 2, p. 123-132, Maio 2004b.

DI MAURO, A. O.; OLIVEIRA, R. C. de.; OLIVEIRA, J. A. de. Capacidade embriogênica da cultivar IAS-5 de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 11, p. 1381-1385, nov. 2001.

DE VIENNE, D.; LEONARDI, A., DAMERVAL, C.; ZIVY, M. Genetics of proteome variation for QTL characterization: application to droughtstress responses in maize. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 332, p. 303-309, Mar. 1999.

DÓCZI, R.; CSANAKI, C.; BÁNFALVI. Expression and promoter activity of the desiccation-specific *Solanum tuberosum* gene, *StDS2*. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 9, p. 1197-1203, Ago. 2002.

Perception of *Bradyrhizobium japonicum* Nod factor by soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] root hairs under abiotic stress conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 408, p. 2641-2646, Set. 2004.

ELSHEIKH, E. A. E.; WOOD, M. Nodulation and N<sub>2</sub> fixation by soybean inoculated with salt-tolerant rhizobia or salt-sensitive *bradyrhizobia* in saline soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 4-5, p. 657-661, Abr.-Maio 1995.

EMRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Soja em números (safra 2008/2009). **EMBRAPA-Soja**. Disponível em: <[http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=294&cod\\_pai=16](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=294&cod_pai=16)>. Acesso em: 25 Ago. 2010.

FLOWERS, T. J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 396, p. 307-319, Fev. 2004.

FRANKEL, N.; HASSON, E.; IUSEM, N. D.; ROSSI, M. S. Adaptive Evolution of the Water Stress-Induced Gene *Asr2* in *Lycopersicon* Species Dwelling in Arid Habitats. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 12, p. 1955-1962, 2003.

FRANKEL, N.; CARRARI, F.; HASSON, E.; IUSEM, N. D. Evolutionary history of the *Asr* gene family. **Gene**, v. 378, n. 1, Ago. 2006.

FRANKEL, N.; NUNES-NESE, A.; BALBO, I.; MAZUC, J.; et al. *ci21A/Asr1* expression influences glucose accumulation in potato tubers. **Plant Molecular Biology**, v. 63, n. 5, p.719-730, Mar. 2007.

FRIEDMAN, M.; BRANDON, D. L. Nutritional and Health Benefits of Soy Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1069-1086, Fev. 2001.

GAO, J. P.; CHAO, D. Y.; LIN, H. X. Understanding Abiotic Stress Tolerance Mechanisms: Recent Studies on Stress Response in Rice. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, n. 6, p. 724-750, Fev. 2007.

GILAD, A.; AMITAI-ZEIGERSON, H.; BAR-ZVI, D.; SCOLNIK, P. A. *ASR1*, a tomato water-stress regulated gene: genomic organization, developmental regulation and DNA-binding activity. **ISHS Acta Horticulturae**, v. 447, p.447-454, 1997.

GOLDGUR, Y.; ROM, S.; GHIRLANDO, R.; SHKOLNIK, D.; SHADRIN, N.; KONRAD, Z.; BAR-ZVI, D. Desiccation and Zinc Binding Induce Transition of Tomato Abscisic Acid Stress Ripening 1, a Water Stress – and Salt Stress – Regulated Plant – Specific Protein, from Unfolded to Folded State. **Plant Physiology**, v. 143, n. 2, p. 617-628, Fev. 2007.

GRAHAM, M. Y.; WEIDNER, J.; WHEELER, K.; PELOW M. J.; et al. Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean by wounding and the *Phytophthora sojae* cell wall glucan elicitor. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 63, n. 3, p. 141-149, Set. 2003.

HARA, M.; KUMAGAI, K.; KUBOI, T. Characterization and Expression of a Water Stress Responsive Gene from a Seashore Plant *Calystegia soldanella*. **Plant Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 277-281, 2002.

HIROMOTO, D. M.; VELLO, N. A. The Genetic Base of Brazilian Soybean (*Glycine max* (L.) MERRIL) Cultivars. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 2, p. 295-306, Jun. 1986.

HONG, S.-H.; KIM, I.-J.; YANG, D. C.; CHUNG, W.-I. Characterization of an abscisic acid responsive gene homologue from *Cucumis melo*. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 378, p. 2271-2272, Nov. 2002.

HOTH, S.; MORGANTE, M.; SANCHEZ, J.-P.; HANAFEY, M. K.; TINGEY, S. V.; CHUA, N.-H. Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 24, p. 4891-4900, Set. 2002.

HOUDE, M.; DANIEL, C.; LACHAPELLE, M.; ALLARD, F.; LALIBERTE, S.; SARHAN, F. Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. **The Plant Journal**, v. 8, n. 4, p. 583-593, Out. 1995.

HU, C. Y. e BODANESE-ZANETTINI, M. H. Embryo culture and embryo rescue for wide cross hybrids. In: Gamborg OL e Phillips (eds) **Plant Cell, Tissue and Organ Cultures: Fundamental Methods**. Springer, Berlin, p. 129-141, 1995.

HU, H.; YOU, J.; FANG, Y.; ZHU, X.; QI, Z.; XIONG, L. Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. **Plant Molecular Biology**, v. 67, n. 1-2, p. 169-181, Maio 2008.

HUGHES, C. A.; BEARD, H. S.; MATTHEWS, B. F. Molecular cloning and expression of two cDNAs encoding asparagine synthetase in soybean. **Plant Molecular Biology**, v. 33, n. 2, p. 301-311, Jan. 1997.

ISHITANI, M.; XIONG, L.; STEVENSON, B.; ZHUL, J.-K. Genetic Analysis of Osmotic and Cold Stress Signal Transduction in Arabidopsis: Interactions and Convergence of Abscisic Acid-Dependent and Abscisic Acid-Independent Pathways. **The Plant Cell**, v. 9, n. 11, p. 1935-1949, Nov. 1997.

ITAI, A.; TANABE, K.; TAMURA, F.; TANAKA, T. Isolation of cDNA clones corresponding to genes expressed during fruit ripening in Japanese Pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai): involvement of the ethylene signal transduction pathway in their expression. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 347, p. 1163-1166, Jun. 2000.

IUSEM, N. D.; BARTHOLOMEW, D. M.; HITZ, W. D., SCOLNIK, P.A. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. **Plant Physiology**, v. 102, n. 3, p. 1353-1354. Ago. 1993.

JI, W.; YONG, L.; LI, J.; DAI, C.-H.; et al. Generation and analysis of expressed sequence tags from NaCl-treated *Glycine soja*. **BMC Plant Biology**, v. 6, n. 4, Fev. 2006.

JIAN, B.; LIU, B.; BI, YURONG, B.; HOU, W.; et al. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 9, n. 59, p. 1-14, Jun. 2008.

JIANG, F. e HARTUNG, W. Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 1, p. 37-43, Jun. 2007.

JEANNEAU, M.; GERENTES, D.; FOUEILLASSAR, X.; ZIVY, M. Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the *Zm-Asr1* gene and increase of water use efficiency by over-expressing C4-PEPC. **Biochimie**, v. 84, n. 11, p. 1127-1135, Nov. 2002.

KACPERSKA, A. Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? **Physiologia Plantarum**, v. 122, n. 2, p. 159-168, Out. 2004.

- KALIFA, Y.; GILAD, A.; KONRAD, Z.; ZACCAI, M.; et al. The water- and salt-stress-regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. **Biochemistry Journal**, v. 381, n. 2, p. 373-378, Jul. 2004a.
- KALIFA, Y.; PERLSON, E.; GILAD, A.; KONRAD, Z.; et al. Over-expression of the water and salt stress-regulated *Asr1* gene confers an increased salt tolerance. **Plant, Cell and Environment**, v. 27, n. 12, p. 1459-1468, Dez. 2004b.
- KARIMI, M.; INZE, D.; DEPCKER, A. Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Trends Plant Science**, v. 7, n. 5, p. 193 -195, Maio 2002.
- KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S.; YAMAGUSHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 287-291, Mar. 1999.
- KAVAR, T.; MARAS, M.; KIDRIC, M.; SUSTAR-VOZLIC, J.; et al. Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. **Molecular Breeding**, v. 21, n. 2, p. 159-172, Fev. 2008.
- KOCSY, G.; LAURIE, R.; SZALAI, G.; SVILÁGY, V.; et al. Genetic manipulation of proline levels affects antioxidants in soybean subjected to simultaneous drought and heat stresses. **Physiologia Plantarum**, v. 124, n. 2, p. 227-235, Jan. 2005.
- KONRAD, Z.; BAR-ZVI, D. Synergism between the chaperone-like activity of the stress regulated *ASR1* protein and the osmolyte glycine-betaine. **Planta**, v. 227, n. 6, p. 1213-1219, Jan. 2008.
- KOORNNEEF, M.; LEON-KLOOSTERZIEL, K. M.; SCHWARTZ, S. H.; ZEEVART, J. A. D. The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 1-2, p. 83-89, Jan.-Fev. 1998.
- LEUNG, J.; GIRAUDAT, J. Abscisic acid signal transduction. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 199-222, Jun. 1998.
- LIAO, Y.; ZHANG, J.-S.; CHEN, S.-Y.; ZHANG, W.-K. Role of Soybean *GmZIP132* under Abscisic Acid and Salt Stresses. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 2, p. 222-230, Fev. 2008a.
- LIAO, Y.; ZOU, H.-F.; WANG, H.-W.; ZHANG, W.-K.; et al. Soybean *GmMYB76*, *GmMYB92*, and *GmMYB177* genes confer stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. **Cell Research**, v. 18, n. 10, p. 1047-1060, Out. 2008b.
- LIBAULT, M.; THIBIVILLIERS, S.; BILGIN, D. D.; RADWAN, O.; et al. Identification of Four Soybean Reference Genes for Gene Expression Normalization. **The Plant Genome**, v. 1, n. 1, p. 44-54, Jul. 2008.
- LIU, F.; ANDERSEN, M. N.; JENSEN, C. R. Loss of pod set caused by drought stress is associated with water status and ABA content of reproductive structures in soybean. **Functional Plant Biology**, v. 30, n. 3, p. 271-280, 2003.

LIVAK, K. J. e SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-DDCT</sup> Method. **Methods**, v. 25, n. 4 , p. 402-408. Dez. 2001.

LU, C. e FEDOROFF, N. A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. **Plant Cell**, v. 12, n.12, p. 2351-2365, Dez. 2000.

LU, H; Dissection of salicylic acid-mediated defense signaling networks. **Plant Signaling & Behavior**, v.4, n.8, p.713-717, Ago. 2009.

LU, X.-Y. e HUANG, X.-L. Plant miRNAs and abiotic stress responses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 368, n. 3, p. 458-462, Abr. 2008.

MA, Y.; SZOSTKIEWICZ, I.; KORTE, A.; MOES, D.; YANG, Y.; CHRISTMANN, A.; GRILL, E. Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1064-1068, Abr. 2009.

MAHAJAN, S. e TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, n. 2, p. 139-158, Out. 2005.

MANAVALAN, L. P.; GUTTIKONDA, S. K.; TRAN, L.-S. P.; NGUYEN, H. T. Physiological and Molecular Approaches to Improve Drought Resistance in Soybean. **Plant Cell Physiology**, v. 50, n. 7, p. 1260-1276, Jul. 2009.

MASKIN, L.; GUDESBLAT, G. E.; MORENO, J. E.; CARRARI, F. O. et al. Differential expression of the members of the *Asr* gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Science**, v. 161, n. 4, p. 739-746, Maio 2001.

MASKIN, L.; FRANKEL, N; GUDESBLAT, G.; DEMERGASSO, M. J.; et al. Dimerization and DNA-binding of ASR1, a small hydrophilic protein abundant in plant tissues suffering from water loss. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 352, n. 4, p. 831-835, Jan. 2007.

MBEGUIE-A-MBEGUIE, D.; GOMEZ, R.-M.; FILS-LYCAON, B. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of an Abscisic Acid-, Stress-, Ripening-Induced (ASR)-Like Protein From Apricot Fruit (Accession No. U93164). The Electronic Plant Gene Register In: **Plant Physiology**, v. 115, p. 1288, 1997.

MCCOURT, P. e CREELMAN, R. The ABA receptors – we report you decide. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 5, p. 474-478, Out. 2008.

MITRA, J. Genetics and gentic improvement of drought resistance in crop plants. **Current Science**, Bangalore, v. 80, n. 100, p.758-763. Mar. 2001.

MURASHIGE, T. e SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n. 3, p. 473-498, Jul. 1962.



- NELSON, D. E.; REPETTI, P. P.; ADAMS, T. R.; CREELMAN, R. A.; et al. Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 42, p. 16450-16455, Ago. 2007.
- NORTH, H. M.; ALMEIDA, A.; BOUTIN, J. P. et al. The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. **The Plant Journal**, v. 50, n. 5, p. 810-824, Abr. 2007.
- OSWALD, N. DIY Electrocompetent *E. coli*. **Bitesize Bio**, Nov 2008. Disponível em: <<http://bitesizebio.com/2008/11/25/diy-electrocompetent-e-coli/>>. Acesso em: 27 Nov. 2008.
- PADMANABHAN, V.; DIAS, D. M. A. L.; NEWTON, R. J. Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) induced by water deficit stress. **Plant Molecular Biology**, v. 35, n. 6, p. 801-807. Dez. 1997.
- PANTALONE, V. R.; KENWORTHY, W. J.; SLAUGHTER, L. H.; JAMES, B. R. Chloride tolerance in soybean and perennial *Glycine* accessions. *Euphytica*, v. 97, n. 2, p. 235-239, out. 1997.
- PARK, S.-Y.; FUNG, P.; NISHIMURA, N.; JENSEN, D. R. et al. Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1068-1071, Abr. 2009.
- PHANG, T.-H.; SHAO, G.; LAM, H.-M. Salt Tolerance in Soybean. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 10, p. 1169-1212, Jun. 2008.
- PIMENTEL, D.; PATZEK, T. W. Ethanol Production Using Corn, Switchgrass, and Wood; Biodiesel Production Using Soybean and Sunflower. *Natural Resources Research*, v. 14, n. 1, p. 65-76, Mar. 2005.
- PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JUNIO, C. T.; ARANTES, N. E.; CONTEL, E. P. Characterization of Brazilian soybean cultivar using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n. 2, p. 185-193. Jun. 2002.
- RICCARDI, F.; GAZEAU, P.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M. Protein changes in response to progressive water deficit in maize: quantitative variation and polypeptide identification. **Plant Physiology**, v. 117, n. 4, p. 1253-1263. Ago. 1998.
- RIVERO, R. M.; KOJIMA, M.; GEPSTEIN, A.; SAKAKIBARA, H.; et al. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 49, p. 19631-19636, Dez. 2007.
- RODRIGUES, S. M.; ANDRADE, M. O.; GOMES, A. P. M.; DAMATTA, F. M. *Arabidopsis* and tobacco plants ectopically expressing the soybean antiquitin-like ALDH7 gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 9, p. 1909-1918, Abr. 2006.

ROM, S.; GILAD, A.; KALIFA, Y.; KONRAD, Z.; et al. Mapping the DNA- and zinc-binding domains of ASR1 (abscisic acid stress ripening), an abiotic-stress regulated plant specific protein. **Biochimie**, v. 88, n. 6, p. 621-628, Jun. 2006.

ROMERO, P.; OBRADOVIC, Z.; LI, X.; GARNER, E.; et al. Sequence complexity of disordered protein. **Proteins**, v. 42, n. 1, p. 38-48, Jan. 2001.

ROSSI, M.; CARRARI, F.; CABRERA-PONCE, J. L., VÁZQUEZ-ROVERE, C.; et al. Analysis of an abscisic acid (ABA)-responsive gene promoter belonging to the *Asr* gene family from tomato in homologous and heterologous systems. **Molecular Genomics and Genetics**, v. 258, p. 1-8, Nov. 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**: 2344 p., 1989.

SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, v. 463, n. 14, p. 178-183, Jan. 2010.

SCHNEIDER, A., SALAMANI, F.; GEBHARDT, C. Expression patterns and promoter activity of the cold-regulated gene *ci21A* of potato. **Plant Physiology**, v. 113, n. 2, p. 335-345, Fev. 1997.

SECRETARIA ESTADUAL DA AGRICULTURA, PECUÁRIA, PESCA E AGRONEGÓCIO. **Indicadores agropecuários**. Disponível em: <<http://www.saa.rs.gov.br/portal/index.html>>. Acesso em: 25 Ago. 2010.

SHEARD, L. B. ; ZHENG, N. Plant Biology: Signal advance for abscisic acid. **Nature**, v. 462, n. 3, p. 575-576, Dez. 2009.

SHEN, G.; PANG, Y.; WU, W.; DENG, Z.; LIU, X.; LIN, J.; ZHAO, L.; SUN, X.; TANG, K. Molecular cloning, characterization and expression of a novel *Asr* gene from *Ginkgo biloba*. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 43, n. 9, p. 836-843. Sep. 2005

SHINOZAKI, K.; YAMAGUSHI-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, n. 3, p. 217-223, Jun. 2000.

SINGH, K. B.; FOLEY, R. C. OÑATE-SANCHEZ, L. Transcription factors in plant defense and stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 5, p. 430-436, Out. 2002.

SCHOEMAKER, R. C.; SCHLUETER, J.; DOYLE, J. J. Paleopolyploidy and gene duplication in soybean and other legumes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 2, p. 104-109, Abr. 2006.

SILHAVY, D.; HUTVÁGNER, G.; BARTA, E.; BÁLFALVI, Z. Isolation and characterization of a water stress-inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*. **Plant Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 587-595, Fev. 1995.

SIMON-SARKADI, L.; KOCSY, G.; VÁRHEGY, A.; GALIBA, G.; et al. Genetic Manipulation of Proline Accumulation Influences the Concentrations of Other Amino Acids

- in Soybean Subjected to Simultaneous Drought and Heat Stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 19, p. 7512-7517, Ago. 2005.
- SPECHT, J. E.; HUMEA, D. J.; KUMUDINIA, S. V. Yield Potential - A Genetic and Physiological Perspective. **Crop Science**, v. 39, n. 6, p. 1560-1570, Nov. 1999.
- STEBER, C. M.; MCCOURT, P. A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 125, n. 2, p. 763-769, Fev. 2001.
- SUGIHARTO, B.; ERMAWATI, N., MORI, H., AOKI, K. Identification and Characterization of a Gene Encoding Drought-Inducible Protein Localizing in the Bundle Sheath Cell of Sugarcane. **Plant and Cell Physiology**, v. 43, n. 3, p. 350-354, Mar. 2002.
- SUNKAR, R.; CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.; ZHU, J.-K. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. **TRENDS in Plant Science**, v. 12, n. 7, p. 301-309, Jul. 2007.
- SUSSMAN, M. R.; PHILLIPS JR., G. N. How Plant Cells Go to Sleep for a Long, Long Time. *Plant Science In: Science*, v. 326, n. 5958, p. 1356-1357, Dez. 2009.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, Maio 2007.
- TAYLOR, I. B.; BURBRIDGE, A.; THOMPSON, A. J. Control of abscisic acid synthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 350, p. 1563-1574, Set. 2000.
- TRIVILIN, A. P. **Superexpressão do gene codificante do peptídeo AtPepI em *A. thaliana* visando a obtenção de resistência à isolados de diferentes espécies do gênero *Phytium***. 95 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- TURNER, N. C.; WRIGHT, G. C.; SIDDIQUE, K. H. M. Adaptation of grain legumes (pulses) to water limited environments. **Advances in Agronomy**, v. 71, 193-231, 2001.
- UVERSKY, V. N.; GILLESPIE, J. R.; FINK, A. L. Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? **Proteins**, v. 41, n. 3, p. 415-27, Nov. 2000.
- VAIDYANATHAN, R.; KURUVILLA, S.; THOMAS, G. Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from Rice. **Plant Science**, v. 140, n. 1, p. 21-30, 1999.
- VAN DE MORTEL, M.; RECKNOR, J. C.; GRAHAM, M. A.; NETTLETON, D.; et al. Distinct biphasic mRNA changes in response to asian soybean rust infection. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 20, n. 8, p. 887-899, Abr. 2007.
- XIE, Z.-M.; ZOU, H.-F.; LEI, G.; WEI, W.; et al. Soybean Trihelix Transcription Factors GmGT-2A and GmGT-2B Improve Plant Tolerance to Abiotic Stresses in Transgenic *Arabidopsis*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, Set. 2009.

- XIONG, L. M. e ZHU, J. K. Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. **Physiologia Plantarum**, v. 112, n. 2, p. 152-166, Jun. 2001b.
- XIONG, L. M.; ISHITANI, M.; LEE, H.; ZHU, J. K. The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress - and osmotic stress - responsive gene expression. **Plant Cell**, v. 13, n. 9, p. 2063-2083, Set. 2001a.
- XIONG, L.; LEE, H.; ISHITANI, M.; ZHU, J. K. Regulation of osmotic stress responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 10, Mar. 2002.
- XU, B. Y.; SU, W.; LIU, J. H.; WANG, J. B. Differentially expressed cDNAs at the early stage of banana ripening identified by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray. **Planta**, v. 226, n. 2, p. 529-539, Jul. 2007.
- XUE, R.-G.; ZHANG, B.; XIE, H.-F. Overexpression of a NTR1 in transgenic soybean confers tolerance to water stress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, n. 2-3, p. 177-183, Jun. 2007.
- ZHANG, G.; CHEN, M.; LI, L.; XU, Z.; et al. Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 13, p. 3781-3796, Jun. 2009.
- ZHU, J.-K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual review of plant biology**, v. 53, p. 247-273. Jun. 2002.
- ZHOU, Q.-Y.; TIAN, A.-G.; ZOU, H.-F.; XIE, Z.-M.; et al. Soybean WRKY-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21* and *GmWRKY54* confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 6, n. 5, p. 486-503. Jun. 2008.
- ZHANG, C.; ZHAO, H.; LIU, Y.; LI, Q.; et al. Isolation and characterization of a novel glycogen synthase kinase-3 gene, *GmGSK*, in *Glycine max* L. that enhances abiotic stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, Jan. 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/n302557tnrg70654/fulltext.pdf>>. Acesso em: 2 Fev. 2010.
- ZHOU, G.A.; CHANG, R.-Z.; QIU, L.-J. Overexpression of soybean ubiquitin-conjugating enzyme gene *GmUBC2* confers enhanced drought and salt tolerance through modulating abiotic stress-responsive gene expression in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, v. 72, n. 4-5, p. 357-367, Mar. 2010.
- ZHU, T.; SCHUPP, J. M.; OLIPHANT, A.; KEIM, P. Hypomethylated sequences: Characterization of the duplicate soybean genome. **Molecular and General Genetics**, v. 244, n. 6, p. 638-645, Nov. 1994.
- ZUNKAR, R.; CHINNUSAMY, V.; Zhu, J.; Zhu, J.-K. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. **TRENDS in Plant Science**, v. 12, n. 7, p. 301-309, Jun. 2007.

- YANG, C. Y.; WU, C. H.; JAUH, G. Y.; HUANG, J. C.; et al. The LLA23 protein translocates into nuclei shortly before desiccation in developing pollen grains and regulates gene expression in *Arabidopsis*. **Protoplasma**, v. 233, n. 3-4, p. 241-254, Nov. 2008.
- YANG, C.Y.; CHEN, Y.C.; JAUH, G.Y.; WANG, C.S. A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 139, n. 2, p. 836-846, Out. 2005.
- WAN, C.; SHAO, G.; CHEN, Y., YAN, S. Relationship between salt tolerance and chemical quality of soybean under salt stress. **Chinese Journal of Oil Crop Sciences**, v. 24, p. 67-72, 2002.
- WANG, C.-S.; LIAU, Y.-E.; HUANG, J.-C.; WU, T.-D.; et al. Characterization of a Desiccation-Related Protein in Lily Pollen during Development and Stress. **Plant Cell Physiology**, v. 39, n. 12, p. 1307-1314, Dez. 1998.
- WANG, H. J.; HSU, C. M.; GUANG, Y. J.; WANG, C. S. A lily pollen ASR protein localizes to both cytoplasm and nuclei requiring a nuclear localization signal. **Physiology of Plants**, v. 123, n. 3, p. 314-320, Fev. 2005.
- WANG, J.; GINDEL, V. M.; PODLICH, D.; YE, G.; et al. Comparison of two breeding strategies by computer simulation. **Crop Science**, v. 43, n. 5, 1764–1773, Set. 2003.
- WANG, X. Q.; ULLAH, H.; JONES, A. M.; ASSMANN, S. M. G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. **Science**, v. 292, n. 5524, p. 2070-2072, Jun. 2001.
- WEI, W.; JIAN, H.; H., Y.-J.; ZOU, H.-F.; et al. Soybean GmPHD-Type Transcription Regulators Improve Stress Tolerance in Transgenic *Arabidopsis* Plants. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. 1-16, Set. 2009.

## ANEXOS

### ANEXO 1

Sequências de cDNA dos genes *GmAsr1*, *GmAsr2* e *GmAsr3*. Em cinza a sequência dos éxons e, em branco, sequência do íntron.

#### ***GmAsr1* (cromossomo 20) - 1661 pb com região codificante de 717 pb**

```

ATGGCCGAAGAGAAACACCACAAGCACCACCTCTTCCACCACCACAAGGACGAGGATAATAAGCCAGTAGAAACC
GATACTGGTTACGACAACACATCATATTTCCAAGCCTTCTGATGACTATGACTCTGGTTTTCAACAAGCCATCGTAT
GAGTCTTCTGGCGGTGGCTATGAAGGTGGTTACAACAAAACATCTTATTCTAGTGATGAGCCAGCTTCTGGTGGT
GGCTATGAAGGTGGGTACAAGAAAACAGGTTATTCTGGTGGCATTGATGAGACTTCTGGTGGCTATGGCGCTGGT
GGTGGTGGATACTCTGACGTCACCTGATGGTGGCTACGGCAAACCAAGTGGTGGCTATGGCGCCGCTGGTGGTGGT
GGTGTGTACCCTGACACTACCCTGATGGTGGGTACAGCAAAACAAGTGGTGGTGGGTATGATGATGAGGTTGAC
TATAAGAAGGAAGAGAAGCACCACAAGCATCTTGAGCACCTTGGTGAGTTAGGTGCTGCATCTGCTGCTGCTTAC
GCCTTGTAATCTTCTTTACCATTATTATTAATTTGCTTTTATATATATAATATAATTTTCACTAAGTTAACATG
AAAATGATTGTAATTAATGTATGTATGCACTAAAGCATTATTTTGTCTTAATTAACCTTTTCATTTGACGGGA
AAATTAATAAAAATTTATTTAAGAATTGTTTTCATAAAAAATTAATTTCTCATAATATTCAAACATTTAATTTTA
ATTTGAGCATATTAATTTATTTTTTCAATTCATTTGGTTATGGATATATACGTTTAGTTTTATGGTCTTGTGGTT
CTGAAATTTCAAAAACTAAAGTTGATTACAAGGACAAAAATTTAGATGCAGTTTTATAGATGTTTGTATGTTG
ATAGTAGTATTATTTTTCATTTTGATATGTTTTGAAATATCATATTTTTTCATTTTAATACGCTTTTTTATTTTA
AAATCATTTTATAATTTTTGTATTAGTAAGTTGAATTAGACAAAGAATTTACCGTTTTCTCTCATTTCTAATTTAA
ATATAAGATAATTCAAATTTAATGGCAATATAAAGTATTTTTTACACTATCAATTGATTACAATGTTATGGATAAT
AATTTTGTCAATTTTTCTAAAAAATATAGTATTTAGAATGATTTATGATTAATTCACATTATATATATATATA
TATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATA
CTTCTGTGTGATTTCTCTTTTGATACTCATTAATAAATTAATTTATTTAAATATTTGTGAATAGAGAGGTAAC
AATTTTATAAACAATTTATCATCACACATATAAGTTGTCATTTTCAATTTTCACCGTATGTTTGAAGGAAAC
AATTAAGATTAATGAAATTTGTTTTGTTGCAATTTGGTTGATATATAGCATGAGAAGCACAAGGCAGAGAAAG
ACCCGAGCATGCTCACAGGCACAAGATAGAAAGAGGAGTTGCAGCAGCAGCTGCAGTGGGATCTGGTGGGTTTG
CCTTCCATGAACATCATGAGAAAAAGGAAGCAAAGGAGCAAGATGAGGAAGCTCATGGAAAGAAGCACCACCATC
TCTTTGGCTGA

```

#### ***GmAsr2* (cromossomo 10) - 1357 pb com região codificante de 642 pb**

```

ATGGCTGAAGAGAAACACCACAACACCACCTCTTCCACCAGCACAAGGACGAGGATAATAAGCCACAGAAACC
GAAACTGGTTACGACAATACATCTTACTCTAAGCCTTCTGATGACTATGACTCTGGTTTTAGCAACCCATCGTAT
GAGACTTCTGGCGGTGCCATGAAACTGGTCAACAAGACATCATATTTCTAGTGATGATCAGCCAGCTTCTGGT
GGTGGCTACAAAAAAAACAGGTTATTCTGGTGGCATTGATGAGACTTCTGGTGGCGGTGGATACGGCGGTGGCGGC
GGTGTGTACTCTGACACTACCCTGATGGTGGATACACCAGAACAAGTGGTGGTGGTATGGTGTGAGGTTGAC
TATAAGAAGGAGGAGAAGCACCACAAGAGTCTTGAGCACCTTGGTGAGTTAGGTGCTGCAGCTGCTGGTGCCTTAC
GCCTTGTAATCTTCTTTACCATTATTATTAATTTTGTCTTTATAATATAATTTTCACTAAGTTAACATAAAAAATGAT
TGTCATTTGTCAATTAATGTATGTATGCATGCAGTTAAACTTTTTTACACAGACATAACACTTTTAGTTTTATGCT
CATGCGGTTCTGAAAATTCGGAAAAC TAGCTAAAGTTTTATTACAAGGACAAAAATTTAAATGCAGTTTTATAAA
GTTTTGATATTATTTTTCATTTTGATATGTTTTGAAATATCATAAAAATTTTCATTTTAATATGTTTTTTTAAAAT
AATTTTATAACTTTTTGTATTCTTAAATAATTTTTATGAGTTGAATCAGACAAAGAATTTACGGTTCCCTCTCATTTT
TAATTTAATTCAAAATTTATTGAAAATATATATTTTTTAAATTTATAATATTTAGAATGATTTATGATTAATTGAC

```

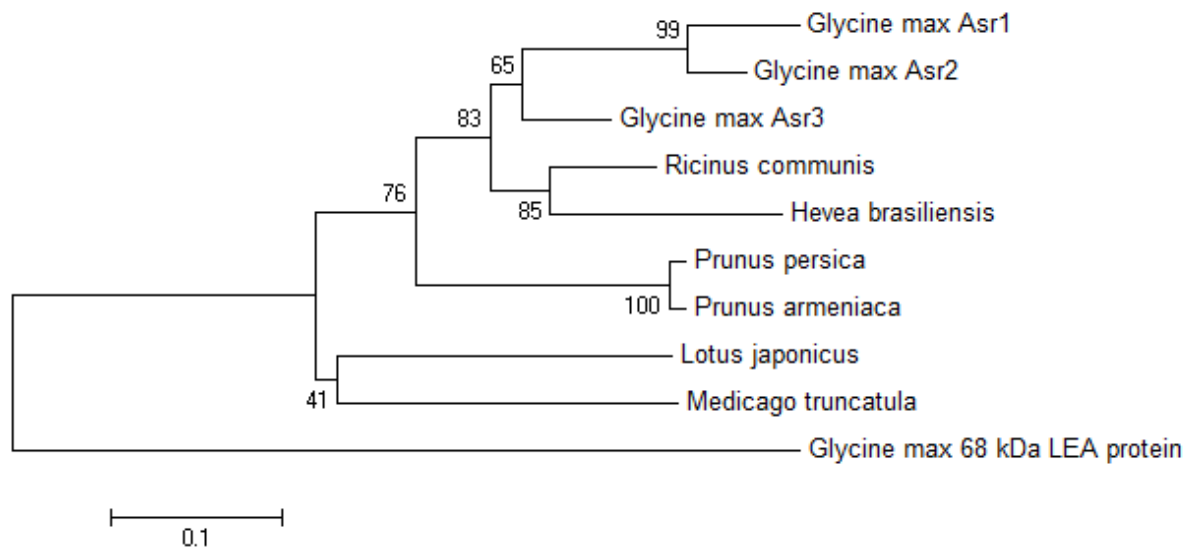
ATTATAAAAAATATTTACATATATATGAAATTAACAACCTCATTTAAATATGTCAAGGGCATGCTAGACTTCTGTG  
 TCTATTTCCCTTTTGATATTCATTGAATAATTAATTTATTTAAATATTTGTGAATAGAGAGATAAATTTTTTTT  
 ATTATAATTAACCAATTATCATCACACATATAAGTGGGTCATTGTCAATTTTCACCGTACATATGTTTCGAAAAG  
 CAAACTTAAATAATTGAAATTTGTTTGTGCAATTGGTTTGATAGCATGAGAAGCACAAGGCAGAGAAAGACCC  
 AGAGCATGCTCACAGGCACAAGATAGAAGAGGAGGTTGCAGCAGCAGCTGCAGTGGGATCTGGTGGGTTTGCTTT  
 TCATGAACATCATGAGAAAAAGGAAGCAAAGGAGCAAGATGAGGAAGCTCATGGAAAGAAGCACCACCATCTCTT  
 TGGCTGA

### ***GmAsr3* (cromossomo 16) - 1233 pb com região codificante de 336 pb**

ATGGCTGAGGAGAAGCACCACCACCCTTCCACCACCACAAGGGCGATGATGTGCCCTGGCGAGGTTGATTATAAG  
 AAGGAGGAGAAGCACCACAAGCAACTTGAGCACCTTGGGGAACCTGGTGCTGCGGCTGCCGGTGCTTATGCCTTG  
 GTAATTAATTATATATCTTCCCTTCAATAATATATTTTGTTCACGATCGTTTATTTAATTTGAAATAGATTTATAT  
 ATTACTTATGTGAGATGATTCACACCCCTTTTTATATATTTTAGCTTTAAATGTTACCTTCACCAGAATAAAT  
 AAAAGAAGTGCAAACTCTTTGTTAATCGAGGGAAATATATATACCTCCCCACATATACATCACTTAGACTT  
 GGACGTATCTAAATCGGTTAATTTAATATGTTTATATGTATGCGTGTGCATTAATAATTTTCATATTTTTTTTT  
 GTAAGCATTTTAAAGCCTTACATATTGAAAAAATGTCATTAATTTGTGTTTTGGACATGAATTAATCCTATCAT  
 CTTGAATCATGTCCACAAATAATTTCAATTTGACATTTTCTTTTTAAGGCGGCCAACATATATACATACTTGATC  
 TTTGTACTTTTGGATTGTGATGCTTTAATAATTGTGGATAATAGATATAAAAAATATATTATAGCTATATAGTATT  
 ATTTCACTCTACCCACTGTGTGTAAGTATACTGTCTATACATCTCATGTGGTTTTGTTTTTCTTAAATGAAAATT  
 GTTGGGGTCATGGGTGTATAGAGTATAGTACTTTTATGACGCCATCAGAAGAGAAACAATAAAAGTTCATAAAAA  
 ATTAGGTGTAGAAAAAGATGGAACCTAAGAAAAGAAAAAGAGAGAGAGAAAGTGATTAAGTGATGTAATATATAA  
 TGAGAAATGAAGAAAAAGATAGGAAGACAAATAAAGTAAAAAAAAGAAAGAAAGAAAGATATATAACAAAAAATT  
 GAAATGTATATTCTAATATGTATTGAAAACAAAATTGATCCCTTTTTGCTGCAATGGTTAATTTTATGACAGCAT  
 GAGAAGCATGAGGCCAAGAAAGACCCAGAGCATGCTCACAGGCACAAGGTAGAAGAGGAGATTGCGGCAGCAGCT  
 ACTGTTGGTGCTGGTGGTTTTGTCTTGCATGAACACCATGAGAAAAAGGAAGTTAAGAAAGAAGATGAGGAAGCT  
 CATGGAAAGAAGCACCACCATCTGTTTGGCTGA

## ANEXO 2

A seguinte figura ilustra a reconstrução filogenética dos genes *Asr* de soja quando comparados aos genes da mesma família em outras dicotiledôneas. De acordo com essas análises *GmAsr1*, *GmAsr2* e *GmAsr3* estão mais relacionados entre si quando comparados aos demais membros da família em outras espécies, sendo que *GmAsr1* e *GmAsr2* possivelmente surgiram em virtude de uma duplicação.



**Figura 27.** Reconstrução filogenética dos genes *Asr* de soja e outras dicotiledôneas. (**Outgroup:** *Glycine max* 68 kDa LEA protein; **Método Estatístico:** Neighbor-joining; **Teste de Filogenia:** método *Bootstrap* com 10000 replicações; **Tipo de Substituição:** Aminoácido; **Modelo/Método:** p-distance; **Gaps/Missing Data Treatment:** Deleção completa).



## ANEXO 3

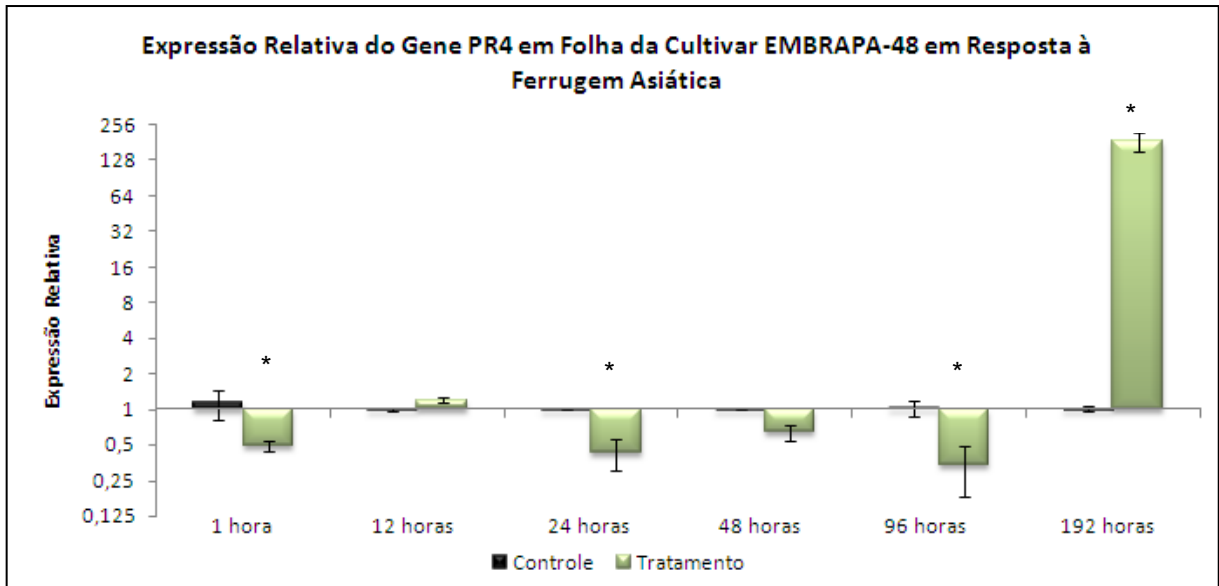
**Análise da Expressão de Genes *Asr* em Resposta à Ferrugem Asiática**

Quando da procura dos genes *Asr* no banco de *ESTs* de soja, percebeu-se a grande representatividade da família em experimentos empregando o ácido salicílico, hormônio cuja função desempenha papel chave na defesa de plantas (LU, 2009). Com a possibilidade do envolvimento das proteínas ASR em resposta a agentes estressores bióticos, foram analisadas plantas de soja com três semanas de idade aspergidas com solução contendo esporos do fungo causador da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*).

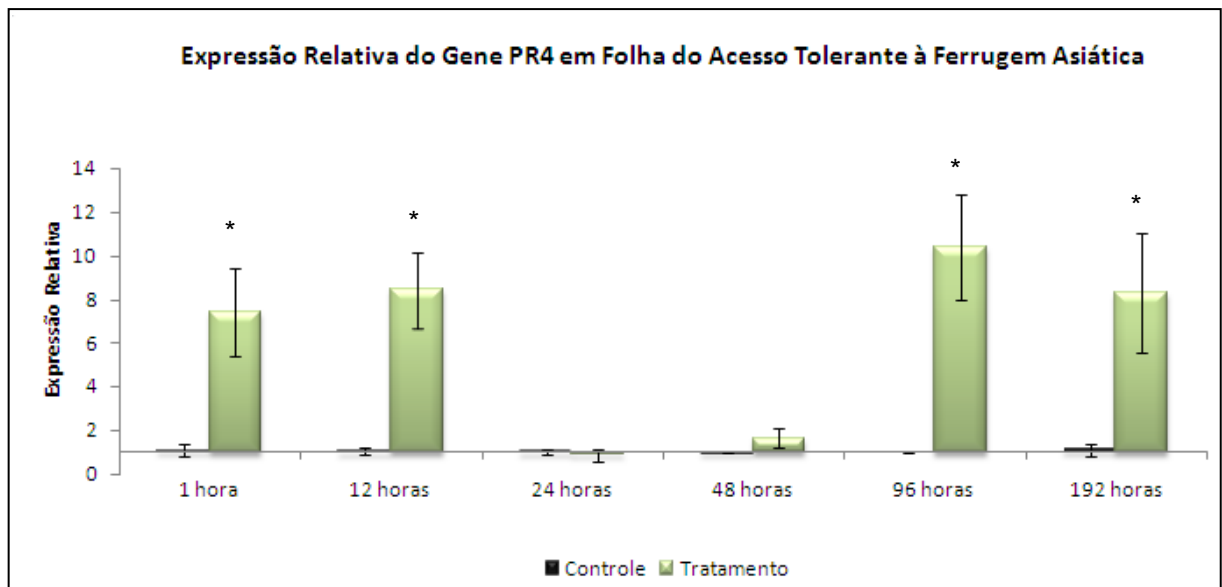
O experimento de infecção de soja por *P. pachyrhizi* (fungo causador da ferrugem asiática) foi realizado na sede da EMBRAPA-SOJA. Plantas de soja da cultivar EMBRAPA-48 (genótipo suscetível) e da linhagem PI 561356 (genótipo resistente) foram semeadas em casa de vegetação. Três semanas após o início do cultivo, foi realizada a inoculação com o patógeno: urediniósporos foram coletados e suspensos em água contendo gotas de Tween-20, para uma concentração final de  $2,6 \times 10^4$  esporos  $\text{ml}^{-1}$ . A solução foi borrifada nas folhas de metade das plantas de cada genótipo, sendo a outra metade utilizada como controle (“*mock-inoculated*”). A inoculação ocorreu após as 18 horas (à noite a umidade é maior, facilitando o processo de infecção pelo fungo) e as plantas inoculadas permaneceram por doze horas cobertas por plástico. Trifolíolos foram coletados 1, 12, 24, 48, 96 e 192 horas após a inoculação, sendo imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^\circ\text{C}$  até o momento da extração de RNA.

Inicialmente, o gene *PR4* (*pathogenesis-related 4*, controle positivo) foi analisado na cultivar EMBRAPA-48, cuja indução nos transcritos ocorreu somente 192 horas após o desafio com o fungo (Figura 28). Fato contrastante é observado no perfil de expressão do

mesmo gene no acesso tolerante, onde se observa um aumento da expressão em 1, 12, 96 e 192 horas após o início da infecção (Figura 29).



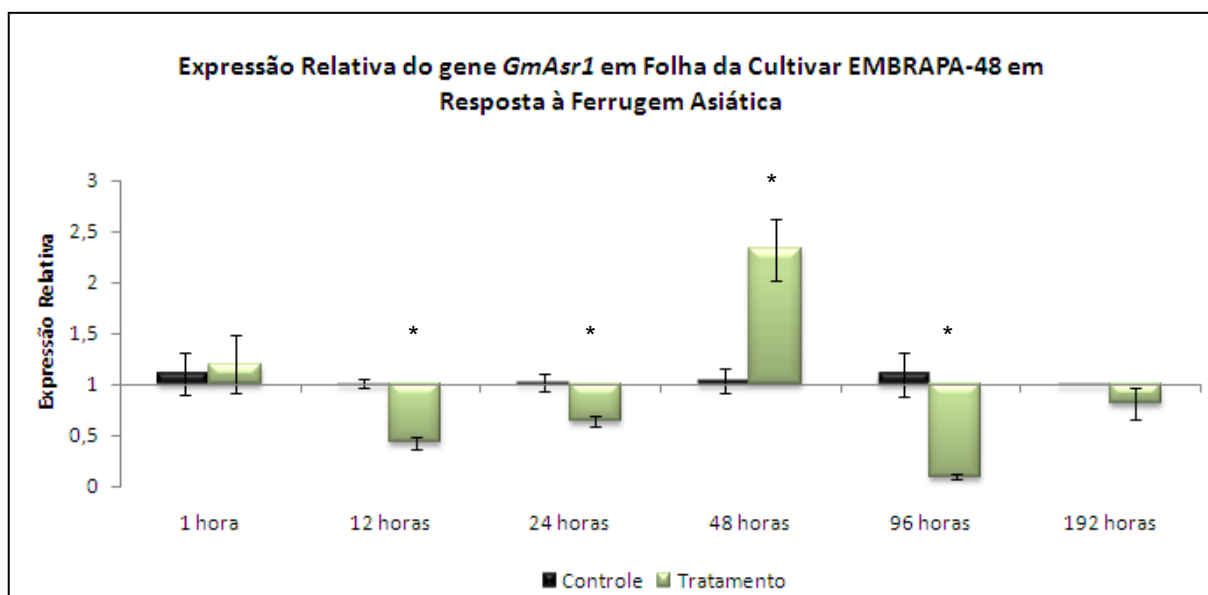
**Figura 28.** Nível de expressão do gene *PR4* em folha de soja em resposta à ferrugem asiática. Os resultados foram normalizados em relação à expressão dos genes *F-Box* e *Metaloprotease* em plantas controle. Asterisco indica diferença significativa.



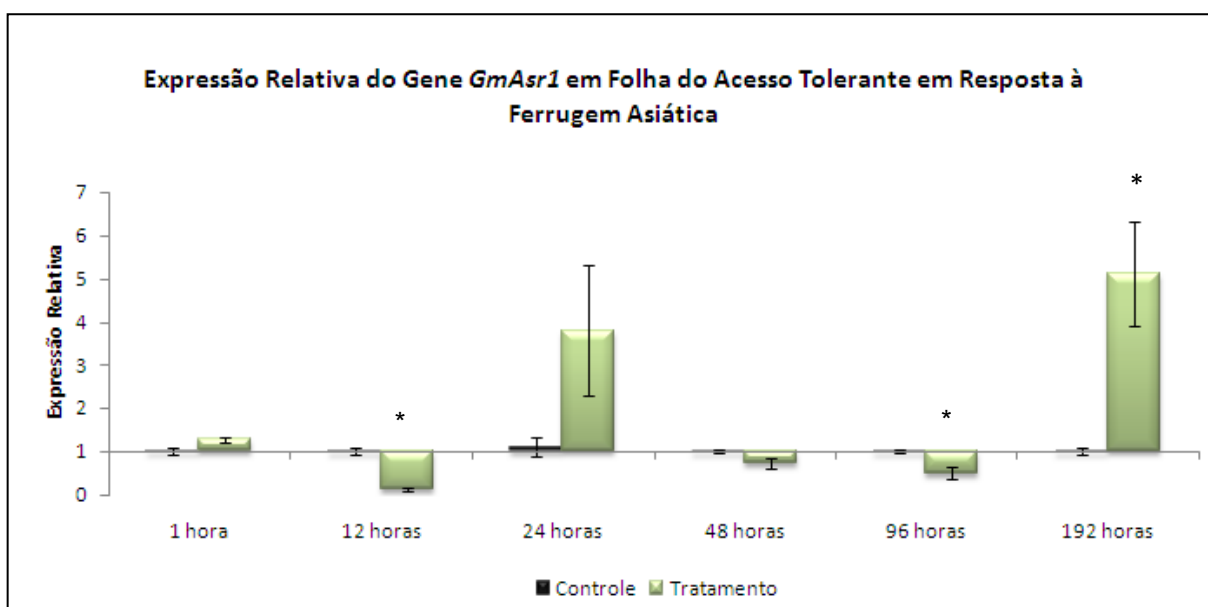
**Figura 29.** Nível de expressão do gene *PR4* em folha de soja em resposta à ferrugem asiática. Os resultados foram normalizados em relação à expressão dos genes *F-Box* e *Metaloprotease* em plantas controle. Asterisco indica diferença significativa.

Quando avaliada a expressão do gene *GmAsr1* na cultivar EMBRAPA-48, percebe-se um único momento de indução, 48 horas após o início do tratamento (Figura 30), sendo que,

no acesso tolerante, um aumento significativo no nível de transcritos ocorreu em 192 horas após a infecção (Figura 31).



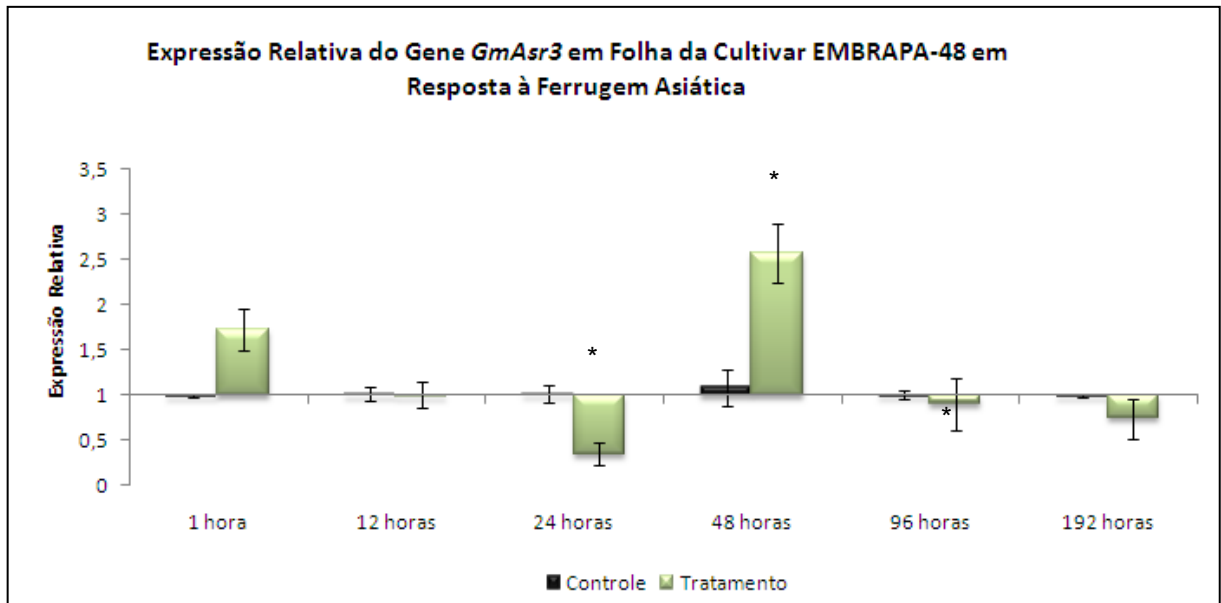
**Figura 30.** Nível de expressão do gene *GmAsr1* em folha de soja em resposta à ferrugem asiática. Os resultados foram normalizados em relação à expressão dos genes *F-Box* e *Metaloprotease* em plantas controle. Asterisco indica diferença significativa.



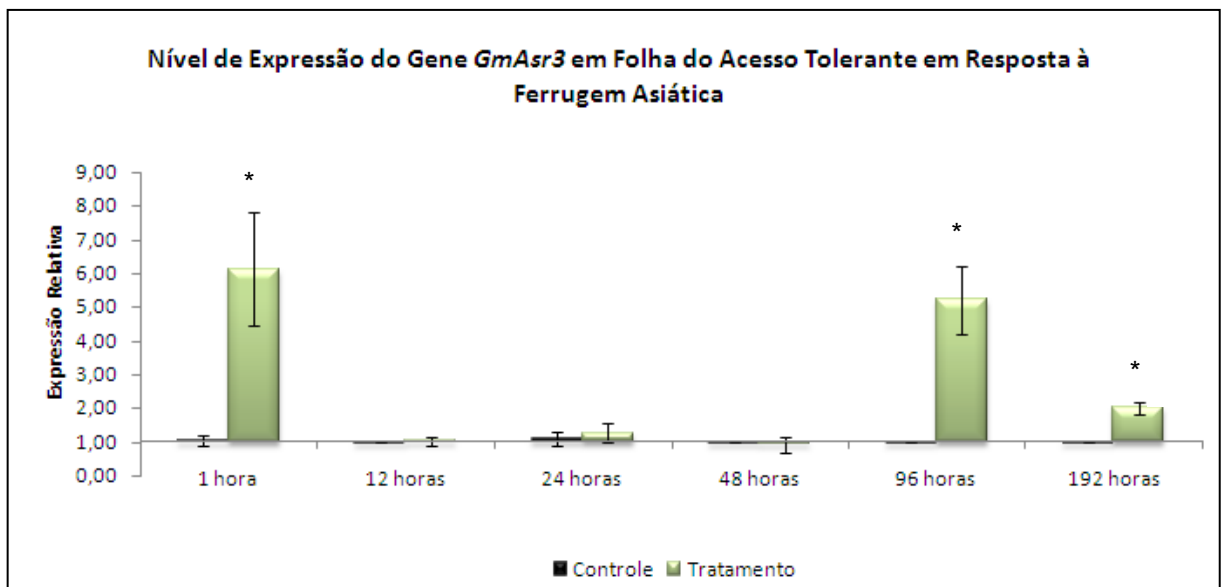
**Figura 31.** Nível de expressão do gene *GmAsr1* em folha de soja em resposta à ferrugem asiática. Os resultados foram normalizados em relação à expressão dos genes *F-Box* e *Metaloprotease* em plantas controle. Asterisco indica diferença significativa.

O gene *GmAsr3* também apresentou o mesmo padrão de expressão do gene *GmAsr1* na cultivar EMBRAPA-48, com uma indução significativa 48 horas após o início do

tratamento (Figura 32). Já no acesso tolerante, a modulação da expressão foi bem diferente, com aumento nos transcritos em 1, 96 e 192 horas após a infecção (Figura 33).



**Figura 32.** Nível de expressão do gene *GmAsr3* em folha de soja em resposta à ferrugem asiática. Os resultados foram normalizados em relação à expressão dos genes *F-Box* e *Metaloprotease* em plantas controle. Asterisco indica diferença significativa.



**Figura 33.** Nível de expressão do gene *GmAsr3* em folha de soja em resposta à ferrugem asiática. Os resultados foram normalizados em relação à expressão dos genes *F-Box* e *Metaloprotease* em plantas controle. Asterisco indica diferença significativa.

No experimento de plantas desafiadas com o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, o gene controle utilizado em nossas análises mostrou padrão de expressão diferencial quando

comparadas a cultivar suscetível e o acesso tolerante (Figuras 28 e 29, respectivamente), sendo que o último apresentou um evidente padrão de modulação bifásico. De acordo com Van de Mortel e colaboradores (2007), uma explicação plausível para a não indução de transcritos nestes horários intermediários (24 e 48 horas) seria a inibição ativa das respostas iniciais do hospedeiro pelo fungo causador da ferrugem asiática.

Quando avaliada a expressão do gene *GmAsr1* na cultivar EMBRAPA-48, percebe-se um único momento de indução, 48 horas após o início do tratamento. Já no acesso tolerante, uma indução no nível de transcritos do mesmo gene ocorre com antecipação de 24 horas. No entanto, esta parece ser somente uma tendência, uma vez que a diferença entre os valores obtidos não é estatisticamente significativa. No acesso tolerante, outro pico de indução do gene *GmAsr1* também é observado em 192 horas após a infecção, período no qual a célula está colapsando (Figura 31). O gene *GmAsr3* apresentou o mesmo padrão de expressão do gene *GmAsr1* na cultivar Embrapa-48, com indução significativa 48 horas após o início do tratamento. Nestes casos, diversos períodos de repressão alternam com alguns picos de indução. É possível que as variações no perfil de expressão dos genes *GmAsr1* (cultivar Embrapa-48 e acesso tolerante) e *GmAsr3* (cultivar Embrapa-48) sejam decorrentes de fatores que não estejam diretamente relacionados à resposta ao fungo *Phakopsora pachyrhizi*.

Das análises conduzidas com os genes *GmAsr1* e *GmAsr3* na cultivar suscetível e no acesso tolerante, os dados mais interessantes são aqueles apresentados na Figura 33, onde o padrão de expressão do gene *GmAsr3* é similar ao encontrado no controle positivo (Figura 29), com destaque para o aumento no número de transcritos observados em 1 hora após contato com o agente causador da doença, momento no qual ocorre a germinação do fungo. Segundo Van de Mortel e colaboradores (2007) *Phakopsora pachyrhizi* inicialmente induz uma resposta não específica que é transiente ou é suprimida quando os primeiros passos na colonização são completados. Genes com potenciais funções regulatórias no reconhecimento,

transdução de sinal e transcrição são diferencialmente expressos (induzidos) de maneira bifásica, respondendo durante o início da infecção, seguidos por um período no qual os níveis de expressão retornam ao mesmo das plantas controle, e findam com uma nova divergência na expressão gênica durante as últimas fases da infecção (momento de rápido crescimento do fungo).

No entanto, por si só esta análise é insuficiente para determinar a influência da modulação de *GmAsr3* em resposta à *Phakopsora pachyrhizi*. Estudos adicionais, como o uso de microarranjo em plantas transgênicas com as proteínas superexpressas ou silenciadas, permitirão determinar os genes modulados por este fator de transcrição, cujo estudo auxiliará na elucidação do real papel desempenhado pela proteína ASR em resposta ao estresse biótico.