

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM AGRONOMIA

LETTICE APARECIDA DIAS CANETE DE LIMA

**TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO DE EVENTOS DE TRIGO
TRANSFORMADOS COM O GENE *p5cs***

Marechal Cândido Rondon

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM AGRONOMIA

LETTICE APARECIDA DIAS CANETE DE LIMA

**TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO DE EVENTOS DE TRIGO
TRANSFORMADOS COM O GENE *p5cs***

Dissertação apresentada a Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, na área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Antônio Carlos Torres da Costa

Co-Orientadora: Eliane C. G Vendruscolo

Marechal Cândido Rondon

2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR.,
Brasil)

Lima, Lettice Aparecida Dias Canete de

L732t Tolerância ao déficit hídrico de eventos de trigo transformados com o gene *p5cs* / Lettice Aparecida Dias Canete de Lima. - Marechal Cândido Rondon, 2010.

73 p.

Orientador: Prof. Antônio Carlos Torres da Costa

Co-Orientadora: Eliane C. G Vendruscolo

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2010.

1. Trigo. 2. Trigo transgênico - Déficit hídrico 3. Trigo - Transformação genética. 4. Transgênicos. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21.ed. 633.11

631.5233

CIP-NBR 12899



Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.



Ata da reunião da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação da Bióloga **LETTICE APARECIDA DIAS CANETE DE LIMA**. Aos dez dias do mês de março de 2010, às 14:00 horas, sob a presidência do Prof. Dr. Antônio Carlos Torres da Costa, em sessão pública reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa da Dissertação da Bióloga LETTICE APARECIDA DIAS CANETE DE LIMA aluna do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Agronomia, nível Mestrado e Doutorado com área de concentração em **"PRODUÇÃO VEGETAL"**, visando à obtenção do título de **"MESTRE EM AGRONOMIA"**, constituída pelos membros: Prof. Dr. Ivan Schuster (COODETEC), Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (UNIOESTE), Prof. Dr. Antônio Carlos Torres da Costa (Orientador).

Iniciados os trabalhos, a candidata apresentou seminário referente aos resultados obtidos e submeteu-se à defesa de sua Dissertação, intitulada: **"Tolerância ao déficit hídrico de eventos de trigo transformados com o gene *p5cs*."**

Terminada a defesa, procedeu-se ao julgamento dessa prova, cujo resultado foi o seguinte, observada a ordem de arguição:

Prof. Dr. Ivan Schuster.....Aprovada
Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães.....Aprovada
Prof. Dr. Antônio Carlos Torres da Costa (Orientador).....Aprovada

Apurados os resultados, verificou-se que a candidata foi habilitada, fazendo jus, portanto, ao título de **"MESTRE EM AGRONOMIA"**, área de concentração: **"PRODUÇÃO VEGETAL"**. Do que, para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos senhores membros da Comissão Julgadora.

Marechal Cândido Rondon, 10 de março de 2010.

Prof. Dr. Ivan Schuster

Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães

Prof. Dr. Antônio Carlos Torres da Costa (Orientador)

Ao meu amado esposo Igor, que com muito amor e paciência me incentivou.

A minha professora e amiga Dra. Eliane, pois sem o seu apoio e dedicação
não seria possível a realização do mesmo.

Aos meus queridos pais Daniel e Eunice.

Ao anjo da minha vida Beatriz.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao senhor meu Deus, por cada dia de minha vida.

Ao Professor Dr. Antônio Carlos Torres da Costa pela oportunidade de aceitação no programa de Pós Graduação como meu Orientador.

A Professora Dra. Eliane Vendruscolo, pelos inestimáveis conhecimentos, ajuda, dedicação, compreensão e incentivo não apenas para este trabalho, mas também na evolução do meu aprendizado .

Ao Professor Dr. Ivan Schuster, pela oportunidade de desenvolver este trabalho no laboratório de Biotecnologia da Coodetec e suas co-orientações.

A Dra. Leandra Texeira, pela sua paciência e ajuda durante a condução dos experimentos.

Ao meu esposo Msc. Igor Vinícius Mussoi de Lima, pelo incentivo e todos os apoios que foram necessários para o desenvolvimento deste estudo.

A toda a equipe do laboratório de Biotecnologia da Coodetec, pela compreensão e colaboração na demanda das análises.

As minhas amigas Priscilla, Heloíse, por todas as formas de colaboração a mim feitas.

RESUMO

O trigo é uma das mais importantes culturas pelo fato de ser base da dieta humana em muitos países. A transformação genética de plantas é considerada uma importante ferramenta na obtenção de genótipos tolerantes aos estresses abióticos pela introdução de genes envolvidos nos mecanismos de proteção celular sob condições de estresse hídrico. A prolina é um osmoprotetor que pode atuar nos diversos mecanismos para o aumento da tolerância ao déficit hídrico das plantas. A enzima .1-pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS), codificada pelo gene *p5cs*, é considerada o passo limitante na rota de síntese de prolina. O estudo da estabilidade de expressão do transgene e a sua produtividade são fundamentais para o lançamento de variedades comerciais transgênicas. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar cinco eventos de transformação, por meio de análises biofísicas e índices de produção, quanto à tolerância ao estresse hídrico. Como resultados obtidos, na avaliação dos seguintes parâmetros: Conteúdo Relativo de água (CRA); concentrações de malondialdeído (MDA), índices de estabilidade de membrana (%) e quantificação de prolina. Como índices de produção foram quantificados: número de sementes/planta, número de espigas/planta, peso médio de 100 sementes/planta e peso total das sementes por planta. Os resultados demonstraram que plantas transgênicas responderam de modo diferenciado aos dois tipos de estresse aplicados (severo e parcial). As plantas dos eventos avaliados sob condições de estresse severo e parcial apresentaram conteúdos maiores de prolina (1,16x a 1,62x mais), níveis menores de MDA e consequentemente e os IEMs destas plantas foram maiores por demonstrarem um mecanismo mais eficiente de proteção das membranas celulares contra o estresse oxidativo. A percepção do estresse severo ocorreu a partir do 8º dia de restrição hídrica severa, enquanto que na restrição hídrica parcial, o início da percepção ocorreu após o 12º dia. Os resultados obtidos para os índices de produção foram similares entre plantas transgênicas dos diferentes eventos e controle estressado, o que demonstra que, embora tenha havido expressão do transgene (*p5cs*) esta maior concentração de prolina não resultou em uma maior produtividade das plantas.

Palavras-chave: Trigo, déficit hídrico, prolina, tolerância, transgênicos

ABSTRACT

Tolerance to water deficit of events transformed wheat with gene p5cs.

Wheat is one of the most important crops because the human diet is based on in many countries. The plant genetic transformation is considered an important tool in obtaining tolerant genotypes to abiotic stresses by the introduction of genes involved in mechanisms of cellular protection. Proline is an osmoprotectant that can act in different mechanisms to increase the tolerance of plants. The enzyme Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS), encoded by the gene p5cs, is considered the limiting step in the proline biosynthesis. The study of the stability of transgene expression and productivity are critical to the commercial release of transgenic varieties. This study was conducted to evaluate five events through biophysical and production analysis under water stress. The results obtained were as the following parameters: relative water content (RWC); malondialdehyde contents (MDA), membrane stability index (%) and proline quantified. Production rates were quantified as the number of seeds per plant, number of ears per plant, 100 seeds average weight per plant and total weight of seeds per plant. The results permitted to conclude that transgenic plants' responses were differently under severe and partial water stress conditions. Plants from different events under severe stress presented a higher content of proline (1.16x to 1.62x greater), lower levels of MDA and the IEMs were higher due to the fact of showing a more efficient mechanism of protection for cell membranes against oxidative stress. The perception of severe stress occurred at the 8th day of water restriction, however in partial water stress, the beginning of perception was after 12 days. The results obtained for production indexes were similar among events and stressed controls, which shows that, although there was expression of the transgene (p5cs) the higher amount of proline did not result in higher production of plants.

Key-Words: Wheat, water deficit, proline, tolerance, transgenic event

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	TRIGO	11
2.2	IMPACTOS ECONÔMICOS DOS ESTRESSES ABIÓTICOS SOBRE A CULTURA DO TRIGO	12
2.3	FISIOLOGIA DO ESTRESSE	13
2.4	PRINCIPAIS EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO NO TRIGO	14
2.5	OSMOPROTETORES.....	15
2.6	PAPEL DA PROLINA DURANTE O ESTRESSE.....	16
2.7	BIOSSÍNTESE DE PROLINA	17
2.8	OXIDAÇÃO DA PROLINA.....	20
2.9	PROLINA E TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS	21
2.10	PROMOTORES ESTRESSE- INDUZIDOS	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	MATERIAL GENÉTICO	26
3.2	ANÁLISE MOLECULAR	26
3.2.1	<i>Extração de DNA genômico</i>	26
3.2.2	<i>Reação em cadeia de polimerase</i>	27
3.3	CONDIÇÕES PARA AVALIAÇÃO DO ESTRESSE HÍDRICO.....	27
3.3.1	<i>Conteúdo relativo de água (CRA)</i>	30
3.3.2	<i>Quantificação de prolina em tecidos de plantas</i>	30
3.3.3	<i>Avaliação do índice de estabilidade de membrana celular (IEM)</i>	31
3.3.4	<i>Avaliação do nível de peroxidação de lipídios (MDA)</i>	31
3.4	ÍNDICES DE PRODUÇÃO	32
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4	RESULTADOS	33
4.1	ANÁLISE MOLECULAR	33
4.2	CONTEÚDO RELATIVO DE ÁGUA (CRA)	33
4.3	CONTEÚDO DE PROLINA	36
4.4	ÍNDICE DE ESTABILIDADE DE MEMBRANA	38
4.5	CONTEÚDO DE MALONDIALDEÍDO (MDA)	41
4.6	ÍNDICES DE PRODUÇÃO	43
5	DISCUSSÃO	47
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

O trigo é cultivado em aproximadamente 17% das áreas cultiváveis no mundo, o que equivale a 200 milhões de hectares e, é uma das principais fontes de calorias e proteínas na dieta humana (JONES, 2005). Na safra brasileira de grãos de 2008 a área de cultivo do trigo foi de aproximadamente 1,81 milhões de hectares resultando em uma produção de 3,82 milhões de toneladas. A previsão da safra 2009 é um aumento de 29,7% na área cultivada, passando para 2,35 milhões de hectares.

Os estresses abióticos tais como frio, seca, salinidade, choque térmico, alagamento, limitam o crescimento vegetal e a produtividade de culturas de interesse agrônômico (HMIDA-SAYARI, 2005; SLAMA et al, 2008). No século 21, a atividade industrial, o aumento da população urbana e a questão ambiental reduziram a disponibilidade de água para a agricultura. Somado a estes fatores, as mudanças climáticas podem modificar os ciclos de chuvas, reduzindo a sua quantidade e tornando os processos de déficit hídrico, mais comuns para a agricultura (CIAIS et al., 2005).

A ocorrência de déficit hídrico em plantas cultivadas afeta o crescimento e o desenvolvimento das culturas em todo o mundo. Um exemplo disso foi a queda na produção de grãos em junho de 2008 devido a estiagem registrada entre abril e maio de 2009 na região Sul e em parte do Centro-Oeste, reduziram a colheita de grãos em 377,5 mil toneladas. De acordo com a décima pesquisa do ciclo 2008/09, divulgada pela CONAB, a estimativa da produção nacional caiu para 133,78 milhões de toneladas, 7,2% em relação ao período anterior.

Quando as plantas se encontram em condições de estresse hídrico, acabam ativando processos físico-químicos muito complexos, envolvendo desde macromoléculas biológicas e pequenas moléculas, tais como ácidos nucleicos (DNA, RNA, microRNAs), proteínas, carboidratos, lipídios, hormônios, íons, radicais livres, e elementos minerais. Os efeitos fisiológicos do déficit hídrico estão relacionados com os efeitos causados por outros estresses abióticos e bióticos: salinidade, altas e baixas temperaturas, acidez, alcalinidade, reações patogênicas, (ERDEI et al., 2002; GLOMBITZA et al., 2004).

O uso do melhoramento clássico para o desenvolvimento de genótipos tolerantes à estresses abióticos enfrenta algumas dificuldades, visto a tolerância ser uma característica de

baixa herdabilidade, o processo de seleção geralmente ocorre em condições não uniformes e apresentam alta interação genótipo x ambiente (SMITH et al., 1990; KIRIGWI et al., 2004).

Deste modo, a transgênia vem se apresentando como opção para o desenvolvimento de genótipos tolerantes com possibilidade de aumento de produtividade para a cultura do trigo (SAHRAWAT et al., 2003; JONES, 2005; PAOLI, 2007). Embora a obtenção de plantas transgênicas por diversas metodologias tem permitido a cultivares de trigo exibir tolerância à seca, estas, têm apresentado baixas performances em termos de produtividade que para o aspecto comercial da triticultura se tornam inviáveis (ANAND et al., 2003).

Os estresses abióticos induzem a transcrição de genes que podem ser amplamente classificados em dois grupos: aqueles que dão proteção e aqueles que regulam o sinal de transdução e expressão gênica associados com outros processos (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000). O primeiro grupo de produtos gênicos está envolvido na proteção celular incluindo osmoprotetores, reciclagem de proteínas, modificações na membrana e proteína detoxificadoras (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997; MOLINARI, 2006; YOSHIDA et al., 2008).

O segundo grupo inclui os genes regulatórios, tais como as moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição, levando à expressão de genes estresse-induzidos e portanto, tem um papel fundamental na resposta ao estresse (SEKI et al., 2003). Dentre os mecanismos de tolerância ao déficit hídrico, destaca-se a osmorregulação, a qual inclui um aumento líquido na concentração de solutos nas células. O acúmulo de osmólitos compatíveis durante o estresse e entre estes, o da prolina é bem documentado (KISHOR et al., 2005, MOLINARI et al., 2006; VENDRUSCULO et al., 2007).

Recentes estudos têm demonstrado que a manipulação genética de genes responsáveis pela biossíntese de metabólitos de baixo peso molecular tem conferido às plantas uma maior tolerância à seca e à salinidade (HANDA et al., 1986, CAMARA et al., 2000, ZHU et al., 2004; MOLINARI et al., 2004). Já foram realizados experimentos com resultados significativos para plantas transformadas, que demonstraram tolerância ao déficit hídrico como: Plantas transgênicas de tabaco, que superexpressaram o gene *p5cs*, aumentaram a tolerância ao estresse hídrico e salino (KISHOR et al., 1995).

Escassos trabalhos relatando a performance de gerações avançadas de eventos transgênicos são encontrados na literatura, sendo assim o estudo da estabilidade de expressão do transgene e a sua produtividade são fundamentais para o lançamento de variedades comerciais transgênicas, principalmente quando o sistema de transformação genético usado foi a biobalística, que se caracteriza por inserir fragmentos gênicos sem o controle do número

e da posição de inserção no genoma. (MLYNOROWA et al., 1996; ULKER et al., 1999; ANAND et al, 2003).

Neste contexto ao longo deste trabalho foram realizadas análises fisiológicas para a verificação do comportamento do transgene na sua geração T₃ mediante a aplicação de estresse hídrico severo e moderado, para fins de obtenção de dados científicos que possam vir contribuir de forma significativa para futuras pesquisas envolvendo biotecnologias e manipulação de genes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Trigo

O trigo (*Triticum aestivum* L.) surgiu a mais de 10.000 anos na região da Mesopotâmia, chamada crescente fértil. O trigo esta atualmente entre as espécies mais cultivadas, da qual são conhecidas mais de 17 mil variedades (FORNASIERI 2008).

O trigo é originário de clima frio, entretanto com a intervenção do homem atuando no melhoramento e adaptação de cultivares a variações fototérmicas, a cultura tem sido explorada nas mais diversas regiões do mundo.

As maiores áreas semeadas com o trigo e as maiores produções deste cereal encontram-se entre o Trópico de Câncer e o paralelo 60° N, e entre o Trópico de Capricórnio e o Paralelo 40° S, regiões de clima temperado a frio. Nas regiões de clima tropical e subtropical, as altitudes mais elevadas compensam, em parte, as maiores temperaturas, contribuindo assim para melhor adaptação da cultura, uma vez que ocorrências térmicas baixas são mais benéficas, principalmente na fase vegetativa. Nas zonas de clima tropical, o México, Colômbia, Peru, Bolívia e parte do Brasil possuem produções de significância econômica (EMBRAPA, 2004).

No Brasil a cultura esta distribuída entre os paralelos de 32° S e 12° S, abrangendo os estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Santa Catarina, Distrito Federal, Goiás e em escala experimental Mato Grosso e Bahia.

O trigo é uma angiosperma da classe das Liliopsidas, pertencente à ordem Poales, família Poaceae e ao gênero *Triticum*. Este gênero é constituído de um grande número de espécies, das quais se encontram em estado silvestre, enquanto outras somente são conhecidas em estado de cultivo. As espécies podem ser divididas em três grupos de acordo com o numero de cromossomos: as diplóides possuem 14 cromossomos, as tetraplóides com 28 cromossomos e as hexaplóides com 42 cromosomos. As espécies diplóides são quase todas silvestres, tais como *T. urartu* Tum., *T. boeoticum* Boiss., *T. monococcum* L. e *T. sinskajae* A Filat & Kurk.

A partir de um cruzamento natural entre uma espécie diplóide de trigo (*T.monococcum*) e uma poaceae silvestre, também diplóide, *Aegilops speltoides*, originou-se um produto diplóide que, após sofrer duplicação cromossômica natural, deu origem ao *T*

turgidum L. e outras espécies tetraplóides: *T dicoccoides* (Korn.) Schweinf., *T dicoccum* (Schavank) Schubl., *T karamyshevii* Nevski, *T jakubzineu* Udacz & Schachm., *T. polonucum* L., *T. ispahanicum* Heslot, *T durum* Desf., *T aesthiopicum* Jakubz., *T. turanicum* Jakubz., *T. araraticum* Jakubz e *T. timopheevi* (Zhuk.) Zhuk. (SOBRINHO & SOUZA, 1983)

Existem diversos usos para o trigo. As farinhas obtidas pela moagem dos grãos são classificadas em 3 tipos principais: 1. trigo de panificação quase exclusivamente obtido de *Triticum aestivum* e participando com 90% da produção mundial. 2. trigo de macarrão, obtido de *Triticum durum* e representando 5% da produção mundial e 3. demais tipos com os restantes 5% da produção mundial (CALDEIRA et al., 2000).

No Brasil, a espécie predominante cultivada é a *T. aestivum* L., mas o trigo duro (*Triticum durum*) começa a ser cultivado em alguns estados do Brasil, como Santa Catarina e Rio Grande do Sul (EMBRAPA, 2004).

2.2 Impactos Econômicos dos Estresses Abióticos sobre a Cultura do Trigo

O Brasil, apesar da sua vasta extensão territorial tem sido o detentor da primeira posição entre os países com maiores importações de trigo, com o Egito em segundo e o Japão em terceiro (CONAB, 2008). No Brasil a produção anual fica entre 5 a 6 milhões de toneladas e a região sul do país responsável por 90% dessa produção. O consumo anual do país é de 10 milhões de toneladas (EMBRAPA TRIGO, 2009) sendo assim o Brasil demonstra dependência para a complementação de seu consumo, chegando a importar no ano de 2006, 7 milhões de toneladas segundo dados do CONAB.

Na safra 2008/2009 foram colhidas 3,8 milhões de toneladas de trigo, sendo que este montante representa apenas 37% do consumo anual (CONAB, 2009). Estes valores são baixos quando comparados com a média de produtividade de outros países como os da União Européia (5,3 toneladas/ha). A baixa produção do trigo no Brasil deve-se a diversos fatores como medidas políticas-econômicas que desestimulam a produção nacional, preços mínimos não vantajosos para o produtor; custos mais elevados de produção visto as condições climáticas propícias para o aparecimento de doenças e a ocorrência de maior número de veranicos nas fases de plantio, espigamento e de geadas na fase de emborrachamento e florescimento.

Pode-se afirmar que o abastecimento mundial de trigo, como o de outros alimentos, esta altamente dependente do clima. Estudos econômicos dos danos causados pelos estresses abióticos são escassos na literatura, em virtude da sazonalidade com que ocorrem e o fato de

ocorrerem associados, como exemplo, seca e infestação de pragas, geadas e alagamentos etc, o que dificulta a real contabilização do dano econômico associado ao fator estressante específico. O Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão do Governo Federal aponta a ocorrência de seca como o principal evento de perdas em culturas (17% dos casos) (GOPFERT, 1993).

No Paraná, estima-se que as perdas por estresses abióticos (seca e geadas, e combinadas) para a cultura de trigo no ano 2000 foram de 64,5%; no ano 2001 de 5,1% ; no ano 2002 de 32% (CONAB, 2008) e 16% na safra de 2008/2009 , devido a estiagem no início do ciclo do trigo no Paraná (IBGE, 2009).

As perdas são também, agravadas pela redução na qualidade dos grãos decorrentes dos estresses, onerando ainda mais o tricultor (HUBNER, 2003).

2.3 Fisiologia do Estresse

Estresses são geralmente definidos como fatores externos que exercem influência desvantajosas na planta. Na maioria dos casos, o estresse é avaliado em relação à sobrevivência da planta, crescimento (biomassa) ou aos processos primários de assimilação (absorção de CO₂ e minerais) que estão relacionados com o desenvolvimento completo (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Segundo KANASHIRO et al, (2009) o estresse abiótico é o principal fator limitante para o crescimento da planta e produção de alimentos em muitas regiões do mundo e seus efeitos tornam-se mais graves. Entre as pressões ambientais, a seca tem o maior efeito na agricultura no mundo inteiro, afetando mais de um quinto das áreas tropicais e subtropicais.

Sendo assim, a seca e as baixas temperaturas são as que mais afetam o crescimento e o desenvolvimento vegetal. As plantas respondem ao déficit hídrico com um número diverso de mudanças fisiológicas e desenvolvimentais (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000). As respostas moleculares e celulares aos estresses têm sido analisadas extensivamente sob o ponto de vista do acúmulo de diversos tipos de proteínas (ÍBA, 2002; THOMASHOW, 1998; GUY et al., 1990; MENESES et al., 2006), açúcares (TABAEI-AGHDADEI et al., 2003); prolina (KISHOR et al., 1995; PARVANOV et al., 2004; SAÍRAM et al., 2002; MENESES et al., 2006; BHATNAGAR-MATHUR et al.,2009); glicinabetaína (HOLMSTROM et al., 2000; CHEN & MURATA,2002; MENESES et al., 2006).

Muitos genes são induzidos pelo estresse devido à seca. Este comportamento sugere a existência de vários mecanismos celulares e moleculares que vão desde a percepção do estresse até a expressão gênica.

2.4 Principais Efeitos do Déficit Hídrico no Trigo

A deficiência hídrica é consequência de um período contínuo ou transitório de seca, que provoca a redução no crescimento das plantas devido à redução do potencial osmótico da planta, da condutância estomática, da fotossíntese e da assimilação de nitrogênio pela planta (RODRIGUES et al., 1998, TAIZ & ZEIGER, 2004, REDDY et al., 2004).

O principal estágio de desenvolvimento no qual a deficiência hídrica causa maior redução floral é o período até o desenvolvimento da inflorescência, antese, fertilização e formação de grãos (BOLANOS & EDMÉADES, 1993; RODRIGUES et al., 1998).

A deficiência hídrica também afeta o padrão de afilhamento da planta de trigo, reduzindo o tamanho e o número de afilhos quando ocorre antes da antese e causando a morte dos afilhos quando ocorre após a antese (LIMIN & FOWLER, 2000).

A redução na área foliar também é observada na cultura do trigo, podendo ter reflexo negativos ou positivos no rendimento de grãos, uma vez que a área foliar influencia na eficiência do uso de água pela planta (RODRIGUES et al., 1998). A redução do número de grãos por espiga é o fator mais associado à redução ao rendimento de grãos (CATTIVELLI et al., 2008).

O déficit hídrico pode causar a redução da produtividade pelo fato de causar redução na expansão celular, levando a um baixo desenvolvimento de meristemas primários, entre eles aqueles que formam as inflorescências (NAN et al., 2002; CATTIVELLI et al., 2008). BOYER & WESTGATE, (2004) observaram que a meiose, a antese e a fertilidade masculina e feminina são também extremamente susceptíveis à seca e a sua falha afeta diretamente o número de grãos na espiga levando sérias perdas na produtividade. O déficit hídrico pode levar também a um florescimento precoce. Este fato, possivelmente está associado à ação do hormônio ácido abscísico (ABA), levaria a um reduzido enchimento de grãos (grãos chochos) (RODRIGUES et al., 1998; FORNASIERI, 2008).

2.5 Osmoprotetores

As plantas têm desenvolvido vários mecanismos de proteção que permitem uma adaptação a ambientes desfavoráveis para garantir a sobrevivência. Um destes mecanismos que é presente na maioria das plantas é o acúmulo de certos metabólitos orgânicos de baixo peso molecular que são conhecidos coletivamente como solutos compatíveis (SAKAMOTO & MURATA, 2000;).

Existe um aumento na concentração de solutos em plantas que são submetidas à algum tipo de estresse. Estes solutos acabam desempenhando papel fundamental no equilíbrio osmótico e na proteção de enzimas na presença de elevadas concentrações de eletrólitos (GREENWAY & MUNNS, 1980).

Os metabólitos que atuam como solutos compatíveis diferem entre as espécies vegetais e incluem polióis/açúcares, aminoácidos e derivados, compostos terciários de sulfato (3-dimetilsulfoniopropionato DMSP) e compostos quaternários de amônio (glicina betaína, prolina-betaína, b-alanina betaína e cholina-O-sulfato) (FLOWERS et al, 2000). Os compostos quaternários de amônio e DMSP são derivados de precursores de aminoácidos (YANCEY, 1994).

Os osmólitos compatíveis compartilham a propriedade de permanecerem invariáveis em pH neutro e serem altamente solúveis em água (BALLANTYNE & CHAMBERLIN, 1994; PARIDA et al.,2008). Além disso, em altas concentrações, tem pequeno ou nenhum efeito sobre a interação de macromoléculas solventes (YANCEY, 1994). Estes compostos têm papel fundamental no ajustamento osmótico do citoplasma da planta durante a resposta ao estresse osmótico (WYN JONES et al., 1977; MORAIS et al., 2006; JALEEL et al., 2007).

O acúmulo de osmólitos em plantas tem sido utilizado como parâmetro para seleção nos programas tradicionais de melhoramento de plantas para aumento de produtividade em ambiente com deficiência hídrica (BELLHASSEM et al., 1995; ZHANG et al., 1999; CLAUSSEN, 2005).

Estes compostos têm como objetivo servir de osmólitos orgânicos com propriedades compatíveis a altas concentrações, que aumentam a capacidade das células vegetais de reter água sem interferir no metabolismo normal celular, agindo como osmoprotetores. Aliada a esta propriedade, em altas concentrações, não possuem quase efeito sobre a interação de macromoléculas solventes, sendo não-tóxicos (TIMASHEFF, 1993; YANCEY, 1994), diferente dos íons orgânicos que entram prontamente na esfera de hidratação de proteínas, favorecendo seu desdobramento. Os osmólitos compatíveis tendem a serem excluídos da

esfera de hidratação das proteínas e estabilizam a estrutura de proteínas e protegem contra a ação de radicais livres (LOW, 1985; NUCCIO et al., 1999).

Estes compostos têm papel fundamental no ajustamento osmótico do citoplasma da planta durante a resposta ao estresse osmótico (WYN JONES et al., 1977; JALEEL, 2007).

O acúmulo de osmólitos em células de plantas resulta em um decréscimo do potencial osmótico e também na manutenção da absorção de água e pressão de turgor da célula, o que contribui para a manutenção dos processos fisiológicos, como abertura estomática, fotossíntese e crescimento da planta (BLUM, 1996).

2.6 Papel da Prolina Durante o Estresse

Uma das comuns respostas de plantas submetidos ao déficit hídrico é a produção e/ou acúmulo dos chamados osmólitos compatíveis (PARIDA et al., 2008).

A prolina pode estar relacionada a diferentes tipos de estresse, como por exemplo, no estresse salino e hídrico, por se tratar de um osmorregulador. Vários autores demonstraram que dentre os solutos orgânicos que são acumulados no citoplasma mediante o estresse, a presença significativa de prolina é observada, com a correlação positiva entre o acúmulo de prolina e a tolerância ao estresse salino (SILVA-ORTEGA et al., 2007), tanto em cultivo *in vitro* (CAMARA et al., 1998), como naqueles envolvendo a planta inteira, servindo até de critério de seleção de cultivares submetidas a condições estressantes (ASHRAF & FOOLAD, 2007).

A prolina é um osmólito compatível, não carregado em pH neutro e altamente solúvel em água. Em grandes concentrações tem pequeno ou quase nenhum efeito nas interações entre macromoléculas e solventes (KISHOR et al., 2005).

O acúmulo de prolina tem sido estudado em muitas espécies sujeitas a estresses hiperosmóticos por mais de 45 anos (SERRAJ & SINCLAIR, 2002; KISHOR et al., 2005; OZDEN et al., 2008). Altos níveis de prolina acumulados em diferentes espécies vegetais submetidas a condições estressantes tais como salinidade, déficit hídrico e baixas temperaturas têm sido relatados na literatura (ZHANG et al., 1995; ZHU et al., 1998; PARVANOV et al., 2004; PARIDA et al., 2008; DORFFLING et al., 2008; OZDEN et al., 2008).

Diversas funções tem sido atribuídas à este aminoácido: a prolina parece estar relacionada com o ajustamento osmótico, visto que o acúmulo de osmólitos compatíveis

aumentam a osmomolaridade celular permitindo a entrada de água na célula e reduzindo a sua saída (SU & WU, 2004; MAIA et al., 2007). A estabilização de membranas e estruturas subcelulares (VANRENSBURG et al., 1993; SILVA-ORTEGA et al., 2007); proteção contra radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (SMIRNOFF & CUMBES, 1989; MATYSIK et al., 2002); proteção de enzimas contra desnaturação e regulação da acidez citosólica pela manutenção da relação NADP⁺/NADPH (VENEKAMP et al., 1989; ALIA, 1993; HARE & CRESS, 1997); aumento da capacidade de solvatação das moléculas (BELLINGER et al., 1987); aceleração do catabolismo da glicose (RONDE et al., 2004) e como uma fonte de carbono e nitrogênio usadas na recuperação pós-estresse (SILVA-ORTEGA, et al., 2007). O papel da prolina durante o processo de recuperação deve ser significativo já que ela proporciona um rápido fornecimento de energia e recicla nitrogênio para a célula.

Em nódulos de raízes, a prolina fornece energia para o ciclo das pentoses e para os bacteróides (FUKUTAKU & YAMADA, 1984; KOHL et al., 1988). Recentemente, OZDEN et al. (2008) sugeriram que a prolina pode estar associada com a redução na difusão do H₂O₂ e com isto reduzir danos do estresse oxidativo que ocorre concomitantemente com o déficit hídrico.

2.7 Biossíntese de Prolina

O aminoácido L-prolina, na sua forma pura, apresenta-se como uma substância incolor, altamente solúvel em água, medianamente solúvel em álcoois, razoavelmente em benzeno e acetona e insolúvel em outros compostos (MILNER-WHITE et al., 1982).

Em plantas, o aminoácido prolina é sintetizado a partir de glutamato via Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C) por duas sucessivas reduções (Figura1), as quais são catalisadas pelas enzimas P5C sintetase (P5CS) e P5C redutase (P5CR) (HARE et al., 1999) ou alternativamente a partir da ornitina pela enzima ornitina δ -aminotransferase-OAT (ROOSENS et al., 1998; LUTTS et al., 1999; SILVA -ORTEGA et al, 2007).

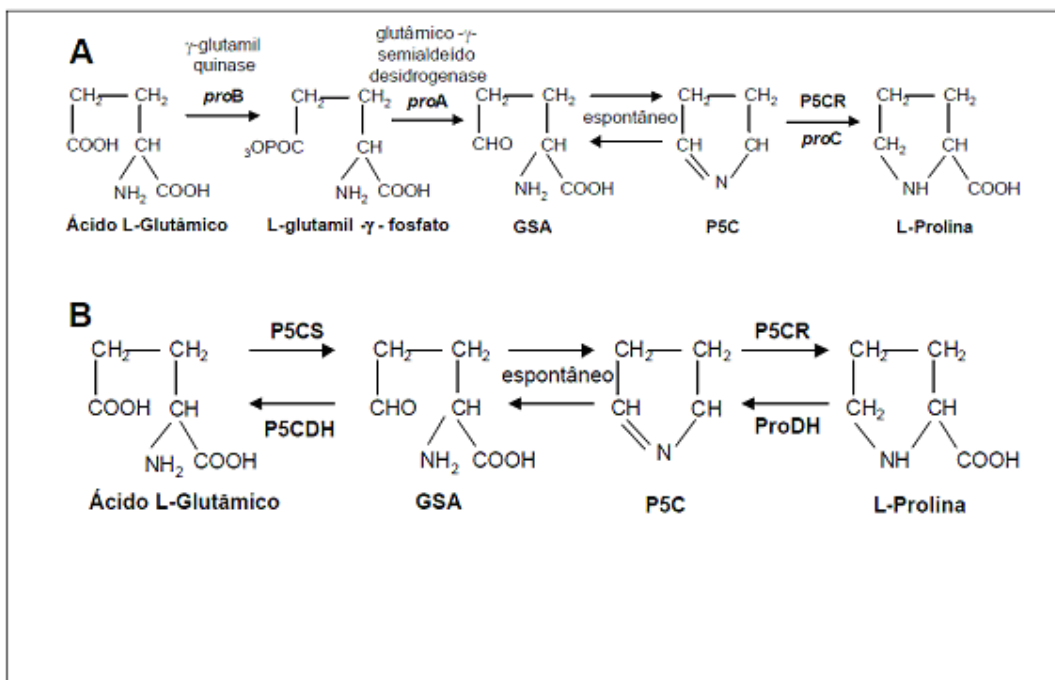


Figura 1: Via metabólica de biossíntese de prolina em bactérias (A) e plantas superiores (B) (Via Glutamato), GSA- Ácido glutâmico semi-aldeído; P5C- Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato; P5CS- P5C sintetase; P5CR- P5C redutase; ProDH- prolina desidrogenase; P5CDH- P5C desidrogenase.

A enzima Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR) foi a primeira a ser identificada e caracterizada em muitas espécies de plantas (LAROSA et al., 1991). A P5CR pode ser encontrada nos cloroplastos (RAYAPATI et al., 1989) e no citosol (SZOKE et al., 1992). As diferentes localizações da enzima P5CR indicam que a prolina pode ser sintetizada em diferentes compartimentos celulares, como no citosol e estroma de cloroplastos, via Fd-GOGAT (glutamato sintase ferredoxina dependente) (Figura 2) (DIAZ et al., 1999).

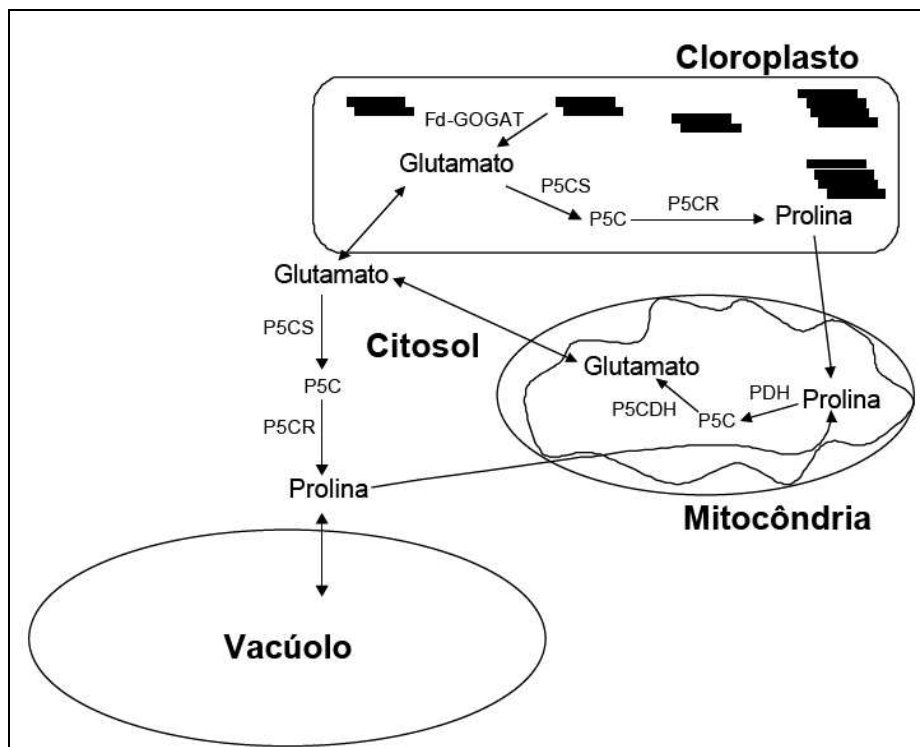


Figura 2. Compartimentos celulares envolvidos no metabolismo de prolina em plantas (DÍAZ et al., 1999).

O cDNA de P5CR de soja, quando superexpresso em tabaco, não resultou em um aumento significativo nos níveis de prolina em plantas transgênicas, apesar de um aumento de 100x na atividade da enzima comparado ao controle (SZOKE et al., 1992). Deste modo, a P5CR não se mostrou como o passo limitante no acúmulo de prolina em plantas superiores (LAROSA et al., 1991; DELAUNEY & VERMA, 1993).

A partir de uma biblioteca de cDNA de *Vigna aconitifolia*, foi encontrado e caracterizado o gene da enzima bifuncional Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase (*p5cs*), que apresenta ambas atividades GK e GPR (HU et al., 1992). Empregando-se mutantes auxotróficos de *E. coli* para prolina *proA*, *proB* e *proBA* foi possível demonstrar o crescimento da bactéria na ausência de prolina. A única e maior ORF (open reading frame) deste cDNA codifica em polipeptídeo de 73,2 kDa, o qual possui dois domínios distintos, exibindo 55,3% de similaridade global para GK de *E. coli* e 57,9% de similaridade para GPR de *E. coli* (HU et al., 1992). A atividade GK da enzima bifuncional P5CS de *Vigna aconitifolia* é inibida por prolina (50% de inibição com 5mM de prolina).

Esta enzima parece ser muito menos sensível por inibição por retroalimentação que o genótipo selvagem GK de *E. coli* (HU et al., 1992). Análises de Northern blot indicaram que o gene *p5cs* é induzido (particularmente em folhas) pelo tratamento de plantas de *Vigna* com

200mM de NaCl (HU et al., 1992). Déficit hídrico, salinidade e ABA induzem fortemente transcritos mRNA do gene *p5cs* em *Arabidopsis* (YOSHIBA et al., 1995). A expressão de genes para a biossíntese de prolina parece ser dependente de duas vias de transdução de sinais; uma ativada por aplicação exógena de ABA (Ácido Abscísico) na ausência de estresse e outra ativada por frio e estresse osmótico independente da aplicação exógena de ABA.

A enzima P5CS é limitante para a síntese de prolina, sendo também sensível à inibição por retroalimentação. Plantas transgênicas de tabaco e algodão superexpressando o gene *p5cs* parecem ter aumentado a sua tolerância ao estresse hídrico e salino (KISHOR et al., 1995). PARIDA et al. (2008) observaram altos níveis de atividade das enzimas P5CS e P5CR quando genótipos de algodão foram submetidos à 14 dias de déficit hídrico.

Contudo, os dados disponíveis parecem insuficientes para se concluir com certeza se o acúmulo de prolina nestas plantas contribuiu para a tolerância via ajustamento osmótico ou por outro mecanismo (SHARP et al., 1996; HARE & CRESS, 1997).

2.8 Oxidação da Prolina

A concentração de prolina envolve a indução (PENG et al., 1996) e/ou ativação de enzimas da biossíntese de prolina, provavelmente junto com o controle da inibição por retroalimentação da via de produção de prolina (PENG et al., 1996).

O acúmulo de prolina depende da sua via de catabolismo, onde a degradação de prolina em plantas é catalisada por duas enzimas.

A prolina é oxidada para P5C pela enzima prolina desidrogenase (PDH) e depois oxidado para glutamato pela enzima P5C desidrogenase (JALEEL, et al, 2007). Estas enzimas estão localizadas na mitocôndria (HARE & CRESS, 1997; HARE et al., 1998). O gene da prolina desidrogenase de *Arabidopsis* mostrou ser induzível por prolina sob condições normais, mas fortemente reprimido em resposta ao estresse osmótico (KIYOSUE et al., 1996)

A atividade das enzimas P5CS e PDH são reciprocamente reguladas em plantas, durante estresse e em recuperação do estresse (PENG et al., 1996). Portanto altas taxas de síntese e baixas de degradação resultam no acúmulo de prolina durante o estresse e o reverso acontece durante a recuperação do estresse. Estes resultados sugerem que o acúmulo de prolina por regulação das enzimas e prolina biossintética estabelece regulamentação das enzimas degradantes têm significativo papel na tolerância à seca (PARIDA et al., 2007).

2.9 Prolina e Tolerância a Estresses Abióticos

A transformação genética de plantas para aumentar a tolerância aos diferentes tipos de estresses abióticos está baseada na introdução de genes de osmoregulação e fatores de transcrição de genes regulados por estresses abióticos (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2005).

Existem variações genotípicas na capacidade de acumular prolina, sendo que existem correlações entre estas alterações e os níveis de tolerância ao estresse ambiental. (MAIA et al., 2007).

Por este motivo, algumas estratégias utilizam a introdução de um ou vários genes envolvidos com as vias de sinalização e regulação ou que codificam enzimas presentes nestas vias levando à síntese de compostos que protegem estruturas celulares, como osmólitos e antioxidantes. A tentativa de superexpressar genes responsáveis pela síntese de solutos compatíveis em plantas transgênicas se constitui uma alternativa para aumentar a tolerância ao estresse em plantas geneticamente modificadas (WANG et al., 2003).

O acúmulo de prolina parece ser uma resposta comum das plantas submetidas a estresses abióticos (DÍAZ et al., 1999; WAY et al., 2005; HONG-BO et al., 2006; JALLEL et al., 2007) e também em plantas halófitas (HMIDA-SAYARI, 2005).

Em estudos de expressão gênica utilizando microarrays para verificar os genes induzidos positivamente a médio e longo período de estresse, o gene da Δ^1 -pirrolina-carboxilato-sintetase (*p5cs*) foi um dos de maior expressão (WAY et al., 2005).

Diversas espécies já foram transformadas com genes pertencentes a via de biossíntese da prolina (Tabela 1). Entre estas, o tabaco (*Nicotiana tabacum*) foi a primeira espécie vegetal transformada com o *p5cs* da *Vigna aconitifolia* utilizando o promotor 35S do vírus do mosaico do couve-flor. Estas plantas produziram 10 a 18 vezes mais prolina, o que resultou em maior tolerância ao estresse salino (KISHOR et al., 1995). A expressão do gene *p5cs* em plantas transgênicas causou aumento nas quantidades de prolina em tecidos foliares, em até cinco vezes, quando comparadas às plantas-controle (CARNEIRO et al., 2006). As plantas transgênicas acumularam maior quantidade de NH_4^+ nas folhas, em relação às plantas não-transgênicas.

Plantas de tabaco transgênicas com o *p5cs* foram mais tolerantes à baixas temperaturas e apresentaram maior biomassa (KONSTANTINOVA et al., 2002). Plantas de tabaco

transgênicas expressando o *p5cs* (*Vigna aconitifolia*) e o gene *p5cs* mutado (*p5csf129a*), cuja mutação sítio-dirigida removeu o feedback da regulação da prolina, foram comparados. As plantas com a forma *p5csf129a* acumularam cerca de 2 vezes mais prolina que a forma original (*Vap5cs* -*Vigna aconitifolia*). Nas plantas com superexpressão do *p5cs* e consequentemente superprodução de prolina, tiveram significativamente maior tolerância ao estresse salino, isto é, concentrações maiores que 200mM de NaCl (ZHANG et al.,1999; HONG et al., 2000).

No arroz (*Oriza sativum*), o gene *p5cs* conferiu altos níveis de tolerância a salinidade (ZHU et al.,1998). Ainda na cultura do arroz, SU & WU (2004), testaram diferentes promotores dirigindo o gene *p5cs*. As plantas com o promotor estresse induzido dirigindo a expressão do gene *p5cs* obtiveram maior acúmulo de prolina, maior biomassa em condições de alta salinidade e déficit hídrico quando comparadas às plantas de expressão dirigida pelo promotor 35S.

Plantas de citrus (*C. sinensis X Poncirus trifoliata*) transformadas com o gene *p5cs* acumularam altos níveis de prolina e foram tolerantes a falta de água por cerca de 24 dias (MOLINARI et al., 2004).

No trigo (*Triticum aestivum* L.), o *p5cs* foi introduzido utilizando *Agrobacterium* via pólen e as plantas apresentaram um aumento na tolerância ao estresse salino (SAWAHEL & HASSAN, 2002). VENDRUSCOLO et al (2007) observaram que plantas transgênicas de trigo, com o gene *p5cs*, mas dirigido por um promotor estresse-induzido apresentaram tolerância a 15 dias sob estresse hídrico severo. A mesma construção foi testada em cana de açúcar e os autores observaram uma tolerância de 12 dias a uma condição de falta de água extrema (MOLINARI et al., 2007). DIBAX, et al. transformou *Eucalyptus saligna* (2009) via *Agrobacterium*, e pode verificar que a quantidade de prolina acumulada na parte aérea de plantas transformadas apresentou ser quatro vezes superior a quantidade encontrada em plantas controle, evidenciando um aumento nos níveis de prolina nos tecidos foliares das plantas transgênicas.

A soja transformada por TEIXEIRA (2009) demonstrou altos índices de produção de prolina, demonstrando menores taxas de peroxidação de lipídios melhor estabilidade de membrana e diferença significativa na produção de grãos.

HMIDA-SAYARI et al. (2005) verificaram que plantas transgênicas de batata (*Solanum tuberosum*) com o gene *AtP5CS* submetidas a altas concentrações de sal (180mM NaCl) tiveram o efeito salino atenuado no crescimento e rendimento, pela presença de prolina como osmoprotetor.

Por outro lado, alguns autores, verificaram que a alta expressão de prolina, pela transgenia não acarretou em aumento de tolerância ao déficit hídrico. BORGIO, (2005) ao estudar as implicações da prolina no ajustamento osmótico em plantas submetidas ao estresse hídrico de tabaco, verificou que plantas contendo o *p5cs* e plantas controle não apresentaram diferenças significativas em relação ao ajustamento osmótico.

MAGGIO et al. (1997) em cultivo de células em suspensão de cenoura superexpressando a prolina, não observaram efeito deste osmólito no ajustamento osmótico das células quando submetidas ao tratamento com PEG (Polietilenoglicol).

Tabela 1-Principais espécies transformadas com genes das vias de biossíntese de prolina.

Gene	Espécie	Estresse aplicado	Referência
<i>p5cs</i>	Tabaco	Salinidade	Kishor et al., 1995
<i>p5csf129a</i>	Tabaco	Salinidade/Seca	Hong et al., 2000
<i>p5cs</i>	Arabidopsis	Seca	Nanjo et al., 1999
<i>p5cs</i>	Arroz	Salinidade/Seca	Zhu et al., 1998
<i>p5cs</i>	Arroz	Salinidade	Anoop & Gupta, 2003
<i>p5cs</i>	Arroz	Salinidade/Seca	Su & Wu, 2004
<i>p5cs</i>	Trigo	Salinidade	Sawahel & Hassan, 2002
<i>p5cs</i>	Cenoura	Salinidade	Han & Hwang, 2003
<i>p5cs</i>	Arroz	Salinidade/Frio	Hur et al., 2004
<i>p5csf129a</i>	Citrus	Seca	Molinari et al., 2004
<i>p5cs</i>	Batata	Salinidade	Hmida-Sayari et al., 2005
<i>p5csf129a</i>	Tabaco	Seca	Borgio et al., 2005
<i>p5cs</i>	Alface	Frio/Salinidade	Pileggi et al., 2001
<i>p5cs</i>	Tabaco	Frio	Konstantinova et al., 2002
<i>p5cs</i>	Trigo	Seca/Frio	Vendrusculo, 2007
<i>p5cs</i>	Cana de Açúcar	Seca	Molinari et al., 2007
<i>p5csf129a</i>	Eucalipto	Frio	Dibax et al., 2009
<i>p5cs</i>	Soja	Seca	Texeira et al., 2009
<i>p5csf129a</i>	Grão de bico	Seca	Mathur et al., 2009

2.10 Promotores Estresse- Induzidos

Os promotores fortes e constitutivos são apropriados em transgênia, para a obtenção de altos níveis de expressão gênica, incluindo a expressão de genes marcadores usados na seleção de plantas transgênicas. Todavia, os promotores constitutivos não são desejáveis pois a superexpressão constitutiva do transgene, pode competir por energia e afetar a síntese de proteínas, RNA, etc., que normalmente são necessárias sob condições normais de crescimento (SU et al., 1998; BAJAJ et al., 1999).

Com os recentes avanços nos estudos dos genes relacionados aos estresses abióticos e bióticos, a caracterização de promotores estresse-induzidos tem aumentado (GROVER et al., 2001). A maioria dos promotores estresse induzido contém uma sequência de elementos atuando em *cis* que são reconhecidos por fatores de transcrição específicos. Exemplos de promotores estresse induzidos são: *hsp* (heat shock protein); *rd29* (induzido por estresse osmótico), *adh* (induzido por estresse anaeróbico), *wcs120* (induzido pelo frio). Os níveis de mRNA do *rd29* mudam em resposta à dessecação, baixas temperaturas, salinidade e exposição ao ABA (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1999).

Estudos realizados em *Arabidopsis* isolaram dois genes *rd29a* e *rd29b*, sendo que o primeiro está envolvido em uma resposta ABA-dependente à seca ou déficit hídrico e o segundo também ABA-dependente porém, de indução mais lenta (GROVER et al., 2001). Outra região de ação *cis*-DRE (Dehydration responsive element) que é constituída de uma sequência conservada de 9 bp (5'-TACCGACAT-3') foi encontrada nos promotores de genes induzidos pelo frio e pelo déficit hídrico. No promotor do gene ligado à anaerobiose (*adh*) existe uma sequência consenso (TGGTTT) denominada ARE (Anoxia response element) (KYOZUKA et al., 1994).

Plantas transgênicas superexpressando o fator de transcrição DREB1A em *A. thaliana* sob o controle do promotor constitutivo CaMV 35S resultou em um retardamento severo do crescimento sob condições não estressantes à planta (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1999). Ao contrário da expressão do DREB1A dirigida pelo promotor *rd29a*, cujo desenvolvimento da planta foi normal, além da planta apresentar maior tolerância ao déficit hídrico.

SHEN & HO (1995) observaram a obrigatoriedade da presença no complexo ABA responsivo (ABRC) de uma sequência G-box ou ABRE3 GCCACGTTACA e um elemento acoplador CE1(TGCCACCGG) para a indução por ABA. A presença de um íntron na expressão do gene *hva22* é também obrigatória.

Outros promotores estresse-induzidos tem sido “engenheirados” (SHEN & HO, 1995; SU & WU, 2004). Estudos com o promotor ABA-responsivo *hva22* de cevada (*Hordeum vulgare* L.) de aproximadamente 49bp (ABRC-ABA responsive complex), ligados a um promotor truncado da α -amilase da cevada (Amy 64) (-60 a +57) e acoplados com uma região de 1-íntron exón -2 intron-2 do gene *hva22* (*hva22I*) induziram cerca de 30 vezes a expressão do gene *uidA* em um experimento com células da camada de aleurona em suspensão de cevada (SHEN et al., 1995). O uso de múltiplas cópias (1 e 4 cópias) da região ABRC originou 2 tipos de promotores sintéticos tendo a região responsiva ao ABA (SU et

al., 1998). Estes promotores testados em arroz aumentaram a expressão do gene *uidA* de 3 a 8 vezes pela aplicação de ABA, déficit hídrico e salinidade e plantas com 4 cópias do complexo ABA responsivo mostraram níveis de 50 a 200% a mais na expressão do gene *uidA*. A presença de apenas 1 cópia seria mais conveniente, visto que o complexo poderia responder a concentrações de ABA menores que 10^{-6} M em aproximadamente 40 minutos (SHEN & HO, 1995).

A mesma construção acima citada foi engenheirada por ZHU et al., (1998) onde o complexo ABA responsivo foi ligado ao promotor mínimo da actina (*ActI-100(P)*) e ao íntron do gene *hva22*, formando a complexo promotor estresse induzido *AIPC*. Este promotor foi testado em arroz e expresso em muitos tipos celulares, como folhas e raízes, como também em camadas de aleurona, tornando-se uma excelente ferramenta para o estudo de genes relacionados com a tolerância aos estresses abióticos em cereais (ZHU et al., 1998; SU & WU, 2004).

O promotor *aipc* já foi testado em três espécies: trigo (VENDRUSCOLO et al., 2007) e cana de açúcar (MOLINARI, 2007), e em soja (TEXEIRA, 2009) plantas de cana e trigo pela presença do déficit hídrico aumentaram os níveis de prolina em duas vezes mais (trigo) e cinco vezes (cana) quando comparada às plantas controle. As plantas transgênicas mostraram-se mais tolerantes ao déficit hídrico aplicado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Genético

O material genético utilizado para o desenvolvimento do estudo da performance dos eventos em gerações avançadas, foi usada a progênie T₃ dos seguintes eventos 14, 164, 312, 326 e 591, resultantes da transformação de VENDRUSCULO 2007.

3.2 Análise Molecular

3.2.1 Extração de DNA genômico

Aos quarenta dias da germinação, o DNA genômico foi extraído de folhas dos 5 eventos e do controle segundo protocolo de DOYLE & DOYLE (1990) adaptado.

Foram macerados cerca de 200 a 300 mg de folha em nitrogênio líquido, utilizando almofariz de porcelana até o tecido virar pó. O macerado foi transferido para microtubos eppendorf (1,5 mL) congelados, devidamente identificados com as amostras. Foram adicionados 800 µL de tampão de extração, e agitado suavemente no vortex. Depois foram incubados em banho-maria a 65° C por 30 min. Durante a incubação os tubos foram agitados suavemente a cada 10 min. Os tubos foram retirados do banho e deixados esfriar a temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados por aproximadamente 10 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e foi adicionado 800µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), que foram agitados suavemente por 5 minutos até ficar turvo, novamente as amostras foram centrifugados por 10 min a 14.000 rpm.

Após a transferência da fase aquosa para um novo tubo foram adicionados 750 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) ao sobrenadante agitando-se suavemente e posteriormente centrifugados por 10 min a mesma velocidade. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e precipitado com 500 µL de isopropanol gelado, deixado fora da geladeira a 20° C por 2 horas. Houve a centrifugação dos tubos a por 10 minutos. O pellet já visível foi lavado 2 vezes com 300 µL de etanol 70% para retirar o sal presente e 1 vez com etanol a 95%. Ao término, o pellet foi deixado secar em temperatura ambiente por 20 min e

ressuspendido em 300µL de TE (10m Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8,0), contendo RNase incubado em Banho-maria por 30 minutos a 37°C na concentração final de (40 µg/ml).

Para aumentar a concentração do DNA foi adicionado à amostra NaCl 5M na proporção 1:10 e 500µL de isopropanol gelado para a precipitação do DNA. As amostras foram incubadas overnight à 4°C e centrifugado. O precipitado originado foi lavado com etanol 70% e 1 vez com etanol a 95%. Este pellet foi deixado para secar em temperatura ambiente por 20 min e ressuspendido em 300 µL de TE.

3.2.2 Reação em cadeia de polimerase

Para comprovar a presença do gene *p5cs* e gene *bar* nos eventos putativamente transformadas T₃, foi realizado uma análise por reação em cadeia de polimerase (PCR).

Foi preparado o mix em um microtubo de 1,5mL contendo 43.2 µL de H₂O, 10.8 µL de MgCl₂, 28.8µL de tampão 14.4µL de dNTPs, 18µL de primer R (5' GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC3') e 18µL de primer F (5'GTCTGCACCATCGTCAACC3'), 1.8µL de Taq polimerase. Em tubos de PCR foram colocados 5 µL do DNA na concentração de 75ng/µL de cada evento e 15 µL do mix.

O programa de ciclos no termociclador para o primer *bar* inicia-se com a desnaturação no primeiro ciclo de 3 minutos a 94° C, seguido de 35 ciclos de 3 segundos a 94°C de desnaturação, 30 segundos a 58 ° C para anelamento, 40 segundos a 72°C extensão, e por fim um ciclo de 7 minutos a 72°C extensão.

Os produtos da reação de PCR foram submetidos a eletroforese em tampão TBE 0,5X em gel de agarose 8%), visualizados após coloração com brometo de etídio (7.0 µL) sob luz UV

3.3 Condições para Avaliação do Estresse Hídrico.

O experimento foi realizado em casa de vegetação, no setor de biotecnologia da COODETEC (Cascavel/Pr). Foram colocados para germinar sementes T₃ dos eventos transformados previamente. No laboratório, as sementes foram germinadas em Papel Germitest 28x38cm. Após 3 dias da germinação foram plantadas 4 sementes em cada vaso de 4 kg contendo solo previamente peneirado e adubado. O desbaste foi feito após 15 dias do plantio deixando apenas uma planta por vaso. Foi utilizado delineamento inteiramente

casualizado contendo 59 vasos, dispostos em posição semelhante em relação incidência solar Figura 3.

O experimento foi composto por cinco eventos e um controle (591, 14, 326, 164, 312 e controle CD200126) conforme croqui na Figura 4. Após o período de estresse foram observadas a recuperação das plantas após o restabelecimento da capacidade de campo do solo nas plantas do estresse severo.

Quando as plantas atingiram a fase de emborrachamento cerca de 60 dias após germinação, correspondente a fase 45 da escala de Zadocks (ZADOCKS et al., 1974) aplicou-se a condição de estresse hídrico, onde os tratamentos constaram de 2 grupos : Grupo I- plantas que foram submetidas ao estresse hídrico com restrição total de água contendo 5 repetições e Grupo II- plantas que foram submetidas a um estresse parcial com 4 repetições .

No estresse severo, as amostras foram coletadas no intervalo de quatro dias, totalizando 6 coletas. Neste tratamento, as plantas controle e transgênicas T₃ foram submetidas a um período de 16 dias de déficit hídrico sendo irrigadas ao término da última coleta do período de estresse. Também foi realizada uma coleta após o quarto dia da re-hidratação, com 20 dias resultando em 6 coletas.

No estresse parcial - as plantas submetidas ao estresse parcial foram submetidas a um período de 24 dias de estresse parcial resultando 7 coletas. As plantas em regime parcial de estresse por déficit hídrico foram pesadas diariamente e foi repostos água aos vasos a quantidade de 50% de seu peso perdido. A coleta de folhas para as análises fisiológicas foram realizadas sempre na parte da manhã entre 8:30 às 10:00 h . As temperaturas também foram anotadas diariamente onde resultou em uma media de 24°C. Foram avaliados os parâmetros: conteúdo relativo de água (CRA); Conteúdo de MDA (malondialdeído); Prolina (PRO); Índice de estabilidade de membrana (IEM) e Índices de produção.



Figura 3. Disposição dos vasos na casa de vegetação dos experimentos: estresse severo e estresse parcial .

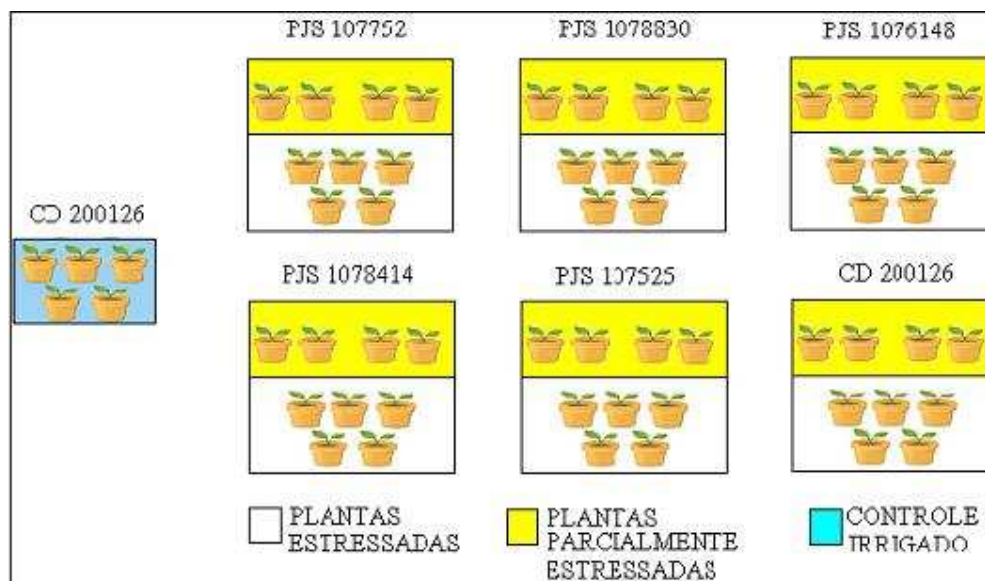


Figura 4. Croqui dos vasos na casa de vegetação dos experimentos: estresse severo e estresse parcial

Para uma melhor análise do índice de produção foram plantadas também 6 repetições dos eventos e controle utilizando delineamento inteiramente casualizado, onde foram aplicados estresse severo nas plantas controle e nos eventos, porém não foram coletadas as folhas, com o objetivo de verificar o efeito de desfolha na recuperação de plantas após o estresse aplicado.

3.3.1 Conteúdo relativo de água (CRA)

O estado da água nas folhas foi monitorado por meio do conteúdo relativo de água (CRA). Imediatamente após o corte de folha na base e sua coleta, as folhas foram seladas em sacos plásticos e transferidas para o laboratório. A massa fresca (m.f) das folhas foi determinada em seguida. A massa túrgida (m.t) foi obtida após o embebição por 16-18h das folhas em água destilada sob temperatura ambiente em frascos de vidro previamente lavados e autoclavados. As folhas foram pesadas rapidamente secadas em papel toalha e a massa seca (m.s) foi obtido após secagem em estufa (70 °C) por 72 horas. O RWC foi calculado segundo a equação de Schonfeld (SCHONFELD et al., 1998).

$$RWC (\%) = (m.f.m.p.s / m.t - m.s) \times 100.$$

3.3.2 Quantificação de prolina em tecidos de plantas

Os níveis de prolina em tecidos de plantas foram determinados pelo método de BATES et al., (1973), modificado conforme descrito a seguir. As folhas coletadas foram armazenadas a 70°C até a realização das análises.

Foram macerados 0.05 g de tecido vegetal em cadinhos com nitrogênio líquido e adicionados em 10mL de ácido sulfosalicílico 3% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos e 2 mL do sobrenadante foram transferidos para um tubo falcon de 15mL. Foram adicionados aos tubos 2 mL de solução de ninidrina (Ninidrina 2,5% (p/v) em 6:4 v/v de ácido acético e ácido fosfórico 6M) e 2 mL de ácido acético glacial e foram aquecidos à 100 °C em banho-maria por 1 hora. A reação foi finalizada adicionando os tubos em banho de gelo. A mistura foi extraída com 4 mL de tolueno e agitada vagarosamente por 15 a 20 segundos em vortex.

O cromóforo dissolvido no tolueno foi aspirado da fase aquosa, a temperatura ambiente e a absorbância deste material foi determinada em espectrofotômetro a 520 nm. A concentração de prolina foi determinada a partir de uma curva padrão de 25 μ moles de prolina por peso seco.

3.3.3 Avaliação do índice de estabilidade de membrana celular (IEM)

O índice de estabilidade de membrana (IEM) celular foi determinado indiretamente pela medida da condutividade elétrica, seguindo o protocolo de BABU et al., (2004). Três amostras de folhas foram coletadas de cada planta, e cortadas em forma de discos de tamanho uniforme de 1cm² cada. Os discos foliares foram lavados por 3 vezes com água deionizada e autoclavada para remoção de eletrólitos aderidos a superfície foliar. Em recipientes de vidro foram adicionados 15 mL de água deionizada e autoclavada, onde os discos foliares foram fechados e incubados no escuro por 24 horas à temperatura ambiente. A condutância desta solução foi medida usando condutivímetro (modelo Micronal B331). Após a medição inicial, os tubos foram autoclavados por 15 minutos sob pressão de 120 psi. A condutividade foi medida nesta solução após o resfriamento dos recipientes de vidro. O índice de estabilidade de membrana foi obtido usando a seguinte fórmula:

Índice de Estabilidade de Membrana (IEM):

$$IEM \% = (1 - S_1/S_2)$$

Onde:

S₁: Condutividade elétrica inicial (antes da autoclavagem)

S₂: Condutividade elétrica final (depois da autoclavagem)

3.3.4 Avaliação do nível de peroxidação de lipídios (MDA)

O nível de peroxidação de lipídios foi determinado em função do conteúdo de MDA (Malondialdeído) pela sua reação com o ácido tiobarbitúrico (SAÍRAM et al., 1998).

Cerca de 0,05g de tecido foliar foram macerados com nitrogênio líquido e posteriormente homogeneizados em 5 mL de ácido tricloroacético 0,1% (p/v), após centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente.

Em tubos Falcon de 15 mL, o sobrenadante foi misturado com igual volume de ácido tiobarbitúrico 0,5 % (p/v) em ácido tricloroacético 20% (p/v) e então fechados. A mistura foi

fervida por 30 minutos a 100°C em banho-maria e centrifugado por 5 minutos a 6000 rpm para precipitação dos subprodutos da reação. A absorbância foi então medida a 532nm e corrigida para turbidez não específica pela subtração da medida a 600nm. O conteúdo de MDA foi calculado usando o coeficiente de extinção molar do MDA ($155 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

$$\text{Equivalente de MDA (nmol ml}^{-1}\text{)} = [(Abs\ 532 - Abs\ 600) / 0,155] / \text{Peso (g)}.$$

3.4 Índices de Produção

Para a avaliação da capacidade de produção das plantas dos eventos submetidos ao estresse hídrico e das plantas controle, foram coletadas e contadas o número de espigas, número de sementes total, peso de 100 sementes e peso total de sementes por planta, ao término do ciclo após a recuperação das plantas submetidas ao estresse.

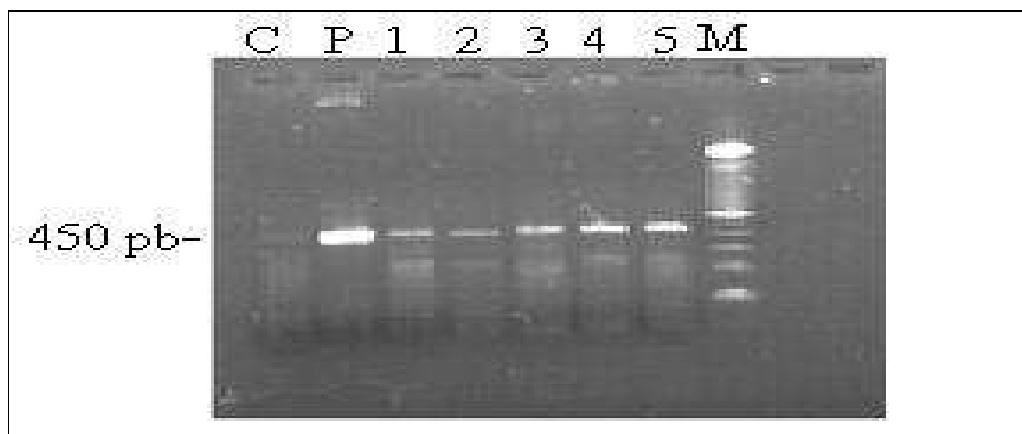
3.5 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância ANOVA com 5% de probabilidade e teste Tukey com o auxílio do programa GENES.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Molecular

As plantas amostradas dos cinco eventos apresentaram o fragmento esperado de 450 pb correspondente ao gene *bar*. Como esperado, as plantas-controle, sem transformação, não apresentaram bandas (Figura 5).



Legenda:

C: controle não transformado;
 P: Plasmídeo pJS107;
 Eventos: 1-164; 2-591; 3-326; 4-312; 6-14;
 M: marcador (Ladder 100 pb).

Figura 5: Produtos de ampliação por PCR:

4.2 Conteúdo Relativo de Água (CRA)

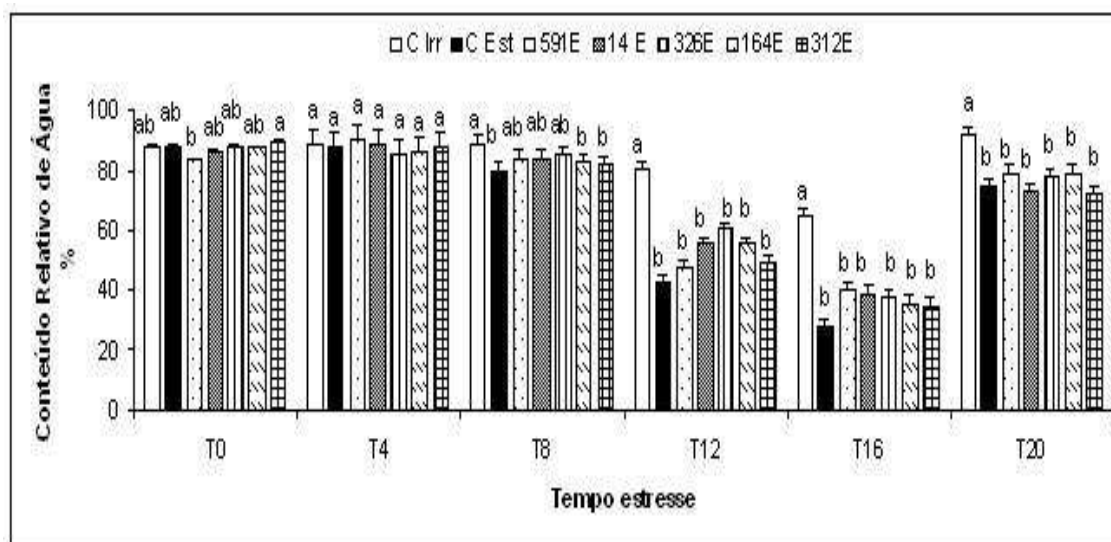
Em condições normais de suprimento de água, os conteúdos relativos de água (CRA) não foram diferentes entre as plantas controle e transgênicas dos diferentes eventos avaliados (Figura 6). Sob condições de estresse, os valores de CRA foram muito similares até o 8º dia de estresse aplicado, sendo que plantas transgênicas dos diferentes eventos obtiveram um CRA ligeiramente superior às das plantas controle estressadas e, menor que o controle irrigado.

À medida que o estresse hídrico foi sendo aplicado (12º dia) claramente se observou um comportamento diferencial entre plantas transgênicas e controles. Destacaram-se os eventos

326, 14 e 164 com valores de CRA de 40%, 29%, 29% respectivamente, maiores comparados ao controle estressado. Os valores de CRA diminuíram à medida que o estresse foi prolongado (16º dia), mas todas as plantas continuaram a ter um CRA maior que o controle estressado. Tal tendência de diminuição do CRA comprova que as plantas sentiram o estresse hídrico a partir do 12º dia de restrição hídrica.

Após o término da restrição hídrica e reidratação das plantas, as plantas transgênicas dos eventos 591,326 e 164 mantiveram índices de CRA mais altos quando comparado aos índices das plantas controle estressado (80%).

Nas plantas controle irrigado em ambos os experimentos foi observado uma flutuação dos valores de CRA, nos diferentes tempos amostrados, evidenciando que neste período de emborrachamento, florescimento e enchimento dos grãos, a demanda por água varia em função de um metabolismo acelerado.



Legenda:

T0, T4, T8, T12, T16, T20 coletas realizadas;

Letras acima das barras: Teste de Tukey;

C Irr: Controle Irrigado;

C Est: Controle Estressado;

14E: Estressado,

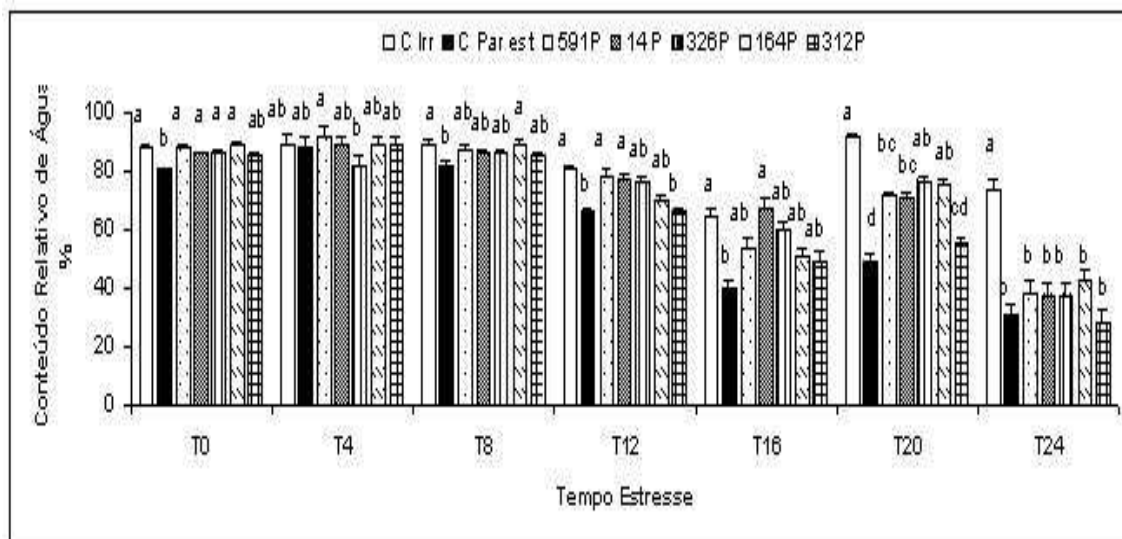
326E: Estressado;

164E: Estressado;

312E: Estressado;

Figura 6: Conteúdo relativo de água (CRA) mediante estresse hídrico severo nos diferentes tempos avaliados.

Quando o experimento foi conduzido sob uma condição parcial de estresse, os dados obtidos foram similares às do experimento com estresse severo até o 8º dia, com exceção das plantas do controle parcialmente estressado que se diferenciaram das demais apresentando um CRA na ordem de 7% menor que o controle irrigado (Figura 7).



Legenda:

T0, T4, T8, T12, T16, T20 coletas realizadas;
 Letras acima das barras: Teste de Tukey;
 C Irr: Controle Irrigado;
 C Par Est: Controle Parcialmente Estressado;
 14P: Parcialmente Estressado,
 326P: Parcialmente Estressado;
 164P: Parcialmente Estressado;
 312P: Parcialmente Estressado;

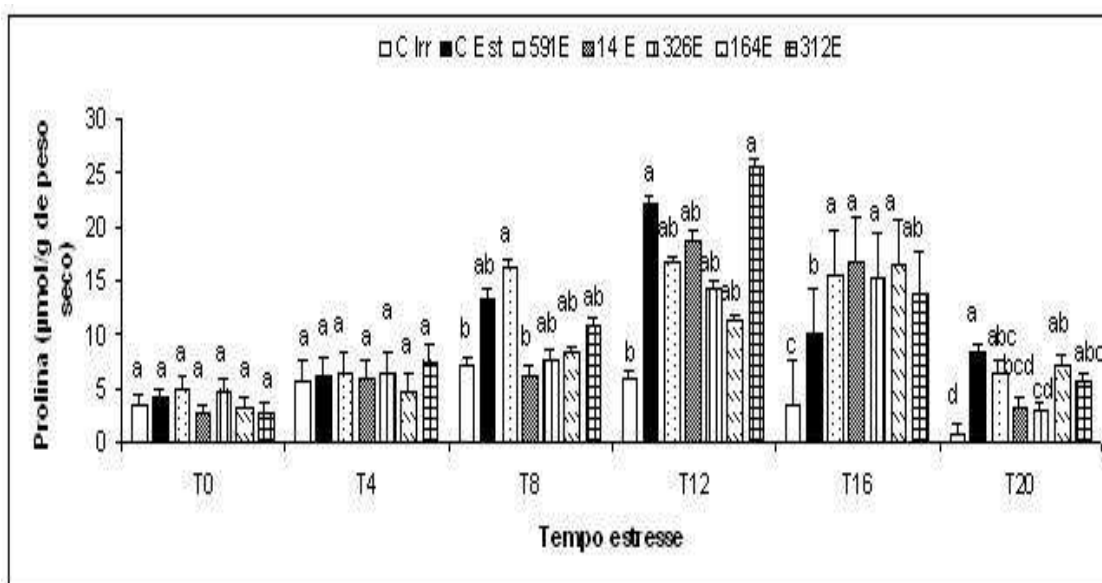
Figura 7: Conteúdo relativo de água de plantas mediante estresse hídrico parcial nos diferentes tempos avaliados.

À medida que o estresse parcial foi sendo aplicado, as plantas controle parcialmente estressadas diminuíram seus índices de CRA em torno de 41%, em média, quando comparado ao controle irrigado. As plantas dos eventos transgênicos tiveram seus índices de CRA superiores às das plantas controle parcialmente estressadas, com distinção do evento 14, cujo CRA foi similar ao das plantas controle irrigadas, mesmo após 16 dias de estresse parcial aplicado. Comparados ao controle irrigado, após vinte dias, os eventos apresentaram CRA maiores que o controle parcialmente estressado na ordem: 44%, 43%, 55%, 51%, 12% correspondente aos eventos 591,14,326,164 e 312, respectivamente.

Após 24 dias de avaliação as plantas transgênicas parcialmente estressadas, demonstraram CRA diminuídos, porém superiores aos valores dos índices de plantas controle parcialmente estressadas, com exceção ao evento 312 que apresentou uma performance de 7% inferior às do controle parcialmente estressado.

4.3 Conteúdo de Prolina

Apesar das plantas controle e transgênicas dos diferentes eventos avaliados terem apresentados valores de prolina diferentes (3,41 ug/ g de peso seco a 4,1 ug/ g de peso seco) em condições normais de suprimento de água, estas não foram significativamente diferentes conforme Figura 8. Esta mesma tendência foi observada após 4 dias de aplicação de estresse severo nas plantas avaliadas. Somente após o 8º dia pode-se observar um aumento brusco no conteúdo de prolina nas plantas controle estressadas na ordem de 1,8 x, comparado ao controle irrigado. As plantas avaliadas do evento 591 tiveram um acréscimo de 2,28x . As plantas transgênicas dos eventos 591 (16,21ug/ g de peso seco no 8º dia) e 312 (25,71 ug/ g de peso seco no 12º dia) apresentaram acréscimos significativos nos níveis de prolina à medida que o estresse foi sendo intensificado.



Legenda:

T0, T4, T8, T12, T16, T20 coletas realizadas;
 Letras acima das barras: Teste de Tukey;
 C Irr: Controle Irrigado;
 C Est: Controle Estressado;
 14E: Estressado,
 326E: Estressado;
 164E: Estressado;
 312E: Estressado;

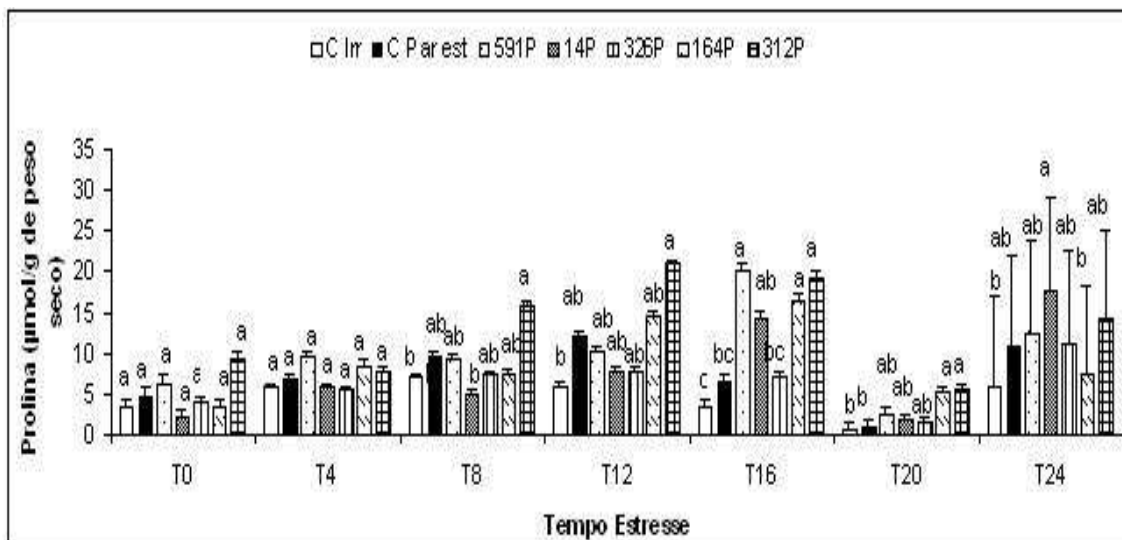
Figura 8. Conteúdo de prolina em $\mu\text{mol/g}$ de peso seco mediante estresse hídrico severo nos diferentes tempos amostrados.

As plantas controle estressadas também tiveram um acréscimo significativo no 12º dia, mas no 16º dia de restrição hídrica, os níveis de prolina diminuíram drasticamente. Por outro lado, as plantas transgênicas dos eventos avaliados continuaram a manter valores altos de prolina quando comparados com o controle estressado.

Após a reidratação, todas as plantas tiveram uma queda nos níveis de prolina, sendo que nos eventos transformados, esta queda foi mais brusca do que a do controle estressado. Em todo o período de avaliação, o evento 591 foi o que apresentou o maior conteúdo de prolina, mas no 12º dia de avaliação, as plantas do evento 312 apresentaram o maior índice (1,16x maior que o controle estressado e 4,35x maior que o controle irrigado. No 16º dia de experimentação, os eventos transgênicos apresentaram níveis altos de prolina comparados aos do controle estressado.

Também foi observada, uma flutuação nos valores de prolina obtidos para o controle irrigado que variaram de 0,74 a 7,09 ug/g de peso seco. Estes valores poderiam ser explicados pelo estágio reprodutivo na qual se encontravam as plantas avaliadas, denotando um metabolismo acelerado onde a prolina é necessária em altas concentrações.

Pode-se observar na Figura 9 que, quando as plantas foram avaliadas sob condições parciais de estresse, os valores para prolina nas condições iniciais foram similares entre as plantas avaliadas. Com 8 dias de restrição hídrica parcial, plantas controle estressadas e irrigadas foram similares, porém as plantas do evento 312 apresentaram acréscimos no conteúdo de prolina estatisticamente significativo (15,87 ug/g de peso seco).



Legenda:

T0, T4, T8, T12, T16, T20 coletas realizadas;
 Letras acima das barras: Teste de Tukey;
 C Irr: Controle Irrigado;
 C Par Est: Controle Parcialmente Estressado;
 14P: Parcialmente Estressado,
 326P: Parcialmente Estressado;
 164P: Parcialmente Estressado;
 312P: Parcialmente Estressado;

Figura 9. Conteúdo de prolina em $\mu\text{mol/g}$ de peso seco mediante estresse parcial hídrico nos diferentes tempos avaliados.

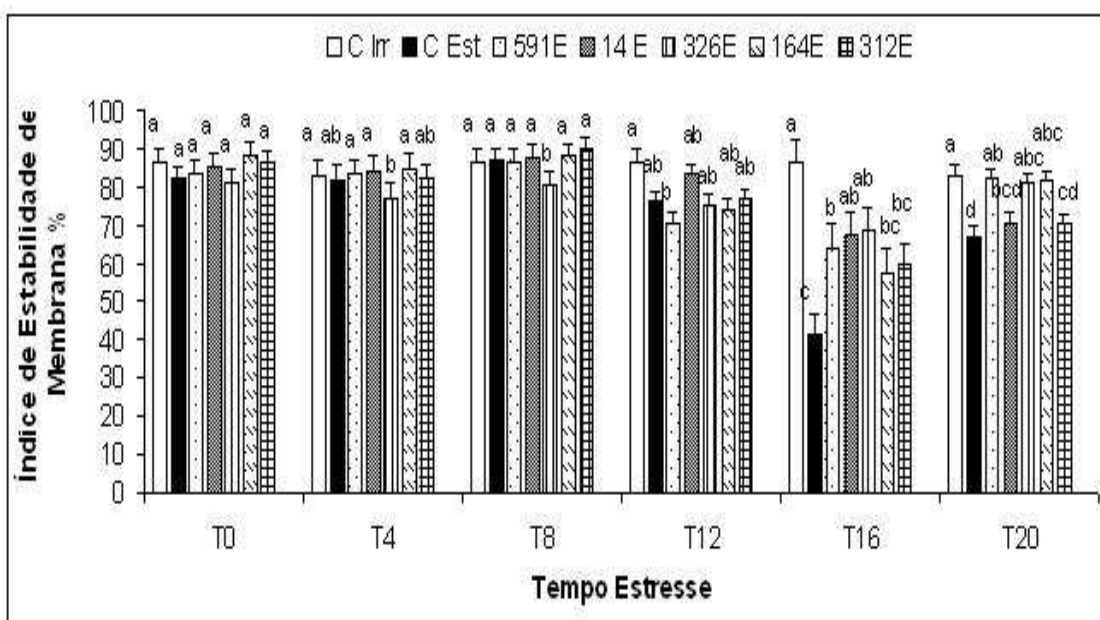
Os maiores conteúdos de prolina foram observados nos eventos 591, 14, 164, 312 (20,15; 14,40; 16,36 e 19,22 $\mu\text{g/g}$ de peso seco em média, respectivamente) no 16º dia de restrição hídrica parcial, com exceção ao evento 326 que estatisticamente foi similar ao controle parcial estressado (6,98 $\mu\text{g/g}$ de peso seco). Após o período de 20 dias, os valores de prolina foram diminuídos e, na coleta do 24º dia os valores de prolina voltaram a aumentar, provavelmente pela necessidade de prolina para a formação de estruturas reprodutivas, tendo em vista o ciclo fenológico a qual as plantas estavam que era de espigamento.

4.4 Índice de Estabilidade de Membrana

Os valores obtidos para o parâmetro de estabilidade de membrana (IEM) sob condições de estresse severo estão apresentados na Figura 10. Observa-se que os valores de IEM para plantas controle e transgênicas, em condições normais de suprimento de água foram

semelhantes e na ordem de 97% em média. O início da percepção do estresse parece ter ocorrido com 12 dias de falta de água. À medida que o suprimento de água foi se tornando escasso, os valores para IEM diminuíram para níveis de 47% nas plantas controle estressadas, 74% (evento 591), 78% (evento 14), 79% (evento 326), 66% (evento 164) e 69% (evento 312).

Após a reidratação das plantas no 16º dia e avaliação no 20º dia, apenas os eventos 591, 326 e 164 tiveram os índices de IEM próximos ao do controle irrigado (83%). Plantas controle estressadas e os eventos 14 e 312 mantiveram o IEM em torno de 68%.



Legenda:

T0, T4, T8, T12, T16, T20 coletas realizadas;

Letras acima das barras: Teste de Tukey;

C Irr: Controle Irrigado;

C Est: Controle Estressado;

14E: Estressado,

326E: Estressado;

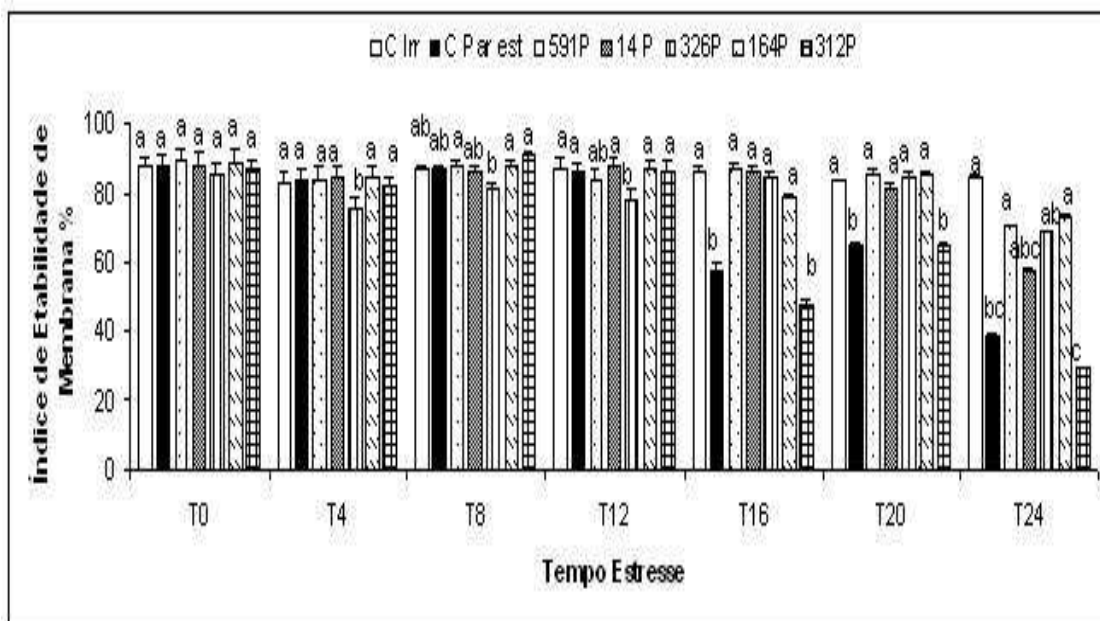
164E: Estressado;

312E: Estressado;

Figura 10. Índice de estabilidade de membrana em % mediante estresse hídrico severo nos diferentes tempos avaliados.

Quando o estresse hídrico aplicado foi parcial, os IEMs das plantas avaliadas apresentaram um comportamento diferenciado aos obtidos no estresse severo. Plantas transgênicas submetidas ao estresse parcial tiveram comportamento similar às plantas irrigadas até o 16º dia. (Figura 11)

O evento 326 foi exceção, pois apresentou IEM menor, já a partir do 4º dia até o 12º dia.



Legenda:

T0, T4, T8, T12, T16, T20 coletas realizadas;
 Letras acima das barras: Teste de Tukey;
 C Irr: Controle Irrigado;
 C Par Est: Controle Parcialmente Estressado;
 14P: Parcialmente Estressado,
 326P: Parcialmente Estressado;
 164P: Parcialmente Estressado;
 312P: Parcialmente Estressado;

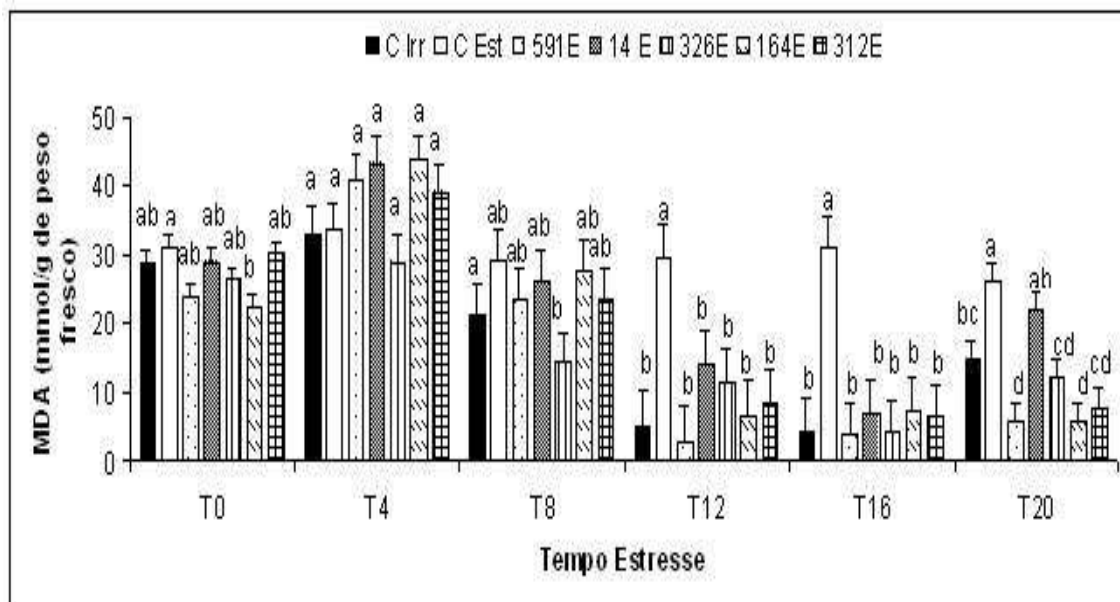
Figura 11. Índice de estabilidade de membrana em % mediante estresse hídrico parcial nos diferentes tempos avaliados.

Com 16 dias de avaliação, as plantas controle estressadas apresentaram IEMs menores e na ordem de 67% e o evento 312 na ordem de 54%. Por outro lado, os eventos 591, 14, 326 e 164 continuaram a manter o IEM na ordem de 83%. Após 20 dias, os índices de IEMs das plantas avaliadas apresentaram a mesma tendência, sendo que ao final de 24 dias de

avaliação, houve uma tendência de diminuição destes índices em todas as plantas avaliadas, com exceção das plantas do controle irrigado, podendo ser possivelmente explicado pela finalização do ciclo reprodutivo e início do enchimento de grãos, evidenciando o início de senescência das plantas após estresse.

4.5 Conteúdo de Malondialdeído (MDA)

Tendo em vista que o baixo conteúdo de malondialdeído representa baixa peroxidação de lipídios e sendo assim inversamente proporcional a estabilidade de membrana, os dados obtidos para peroxidação de lipídios estimado através do conteúdo de malondialdeído (MDA) permitem concluir uma melhor habilidade das plantas transgênicas como as plantas do evento 164 em conservar intacta a célula vegetal por mais tempo (Figura 12).



Legenda:

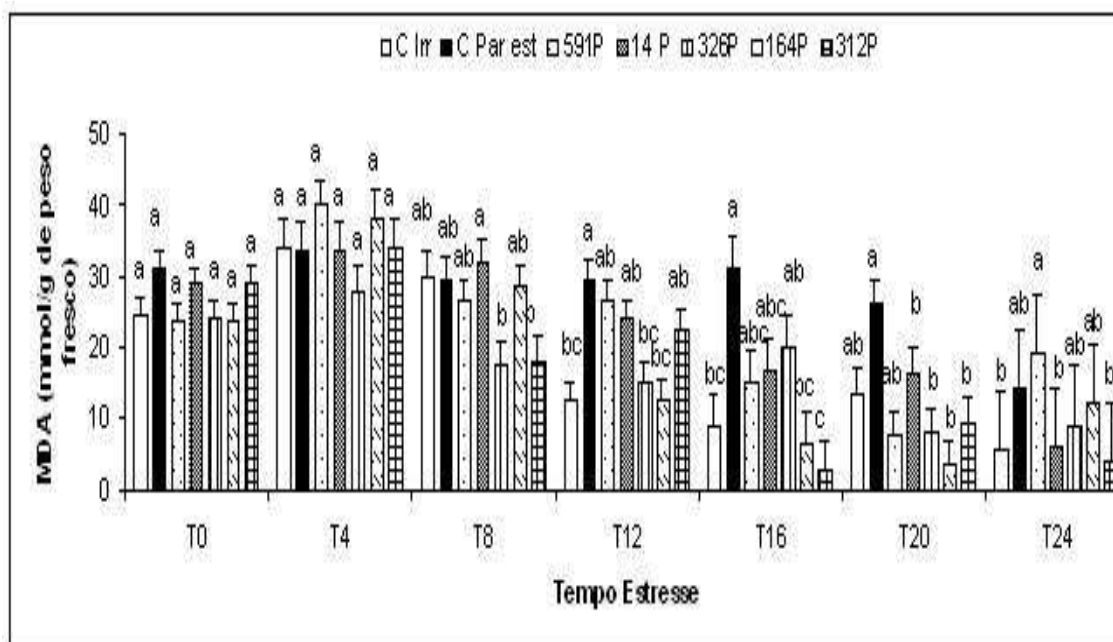
T0, T4, T8, T12, T16, T20 coletas realizadas;
 Letras acima das barras: Teste de Tukey;
 C Irr: Controle Irrigado;
 C Est: Controle Estressado;
 14E: Estressado,
 326E: Estressado;
 164E: Estressado;
 312E: Estressado;

Figura 12: Conteúdo de MDA (Malondialdeído) em nmol/g de peso fresco mediante estresse hídrico severo nos diferentes tempos avaliados.

Os conteúdos de MDA estimados para as plantas controle e transgênicas dos diferentes eventos foram considerados estatisticamente similares no tempo inicial sem restrição hídrica. Após 4 dias de estresse total, as plantas controle foram similares em termos de conteúdo de MDA não diferindo estatisticamente, mas podendo notar que as plantas transgênicas tiveram um acréscimo no conteúdo de MDA, com exceção do evento 326 (29,13 mmol/g de peso fresco). No oitavo dia, em geral, as plantas controle estressadas e as plantas dos diferentes eventos, tiveram o conteúdo de MDA similar ao do período inicial, mas menores comparados aos do 2º período de avaliação.

Após o 12º dia de aplicação da restrição hídrica, plantas transgênicas apresentaram valores de MDA ainda menores não tendo diferença significativa comparada ao controle irrigado, com indicação de que o evento 591 apresentou o menor índice (2,92 mmol/g de peso fresco) que corresponde a uma redução de 10x no MDA em relação às plantas controle estressadas (29,54 mmol/g de peso fresco). Após a reidratação e avaliação no 20º dia, os valores de MDA voltaram a aumentar provavelmente pela aceleração do metabolismo e início da senescência, sendo que, apenas as plantas dos eventos 591 e 164 apresentaram níveis de MDA inferiores e estatisticamente significativos quando comparados aos dos controles irrigado ou estressado.

Conforme a Figura 13 no estresse parcial, os comportamentos de plantas controle e estressadas frente ao MDA foram similares até o 8º dia de restrição hídrica parcial.



Legenda:

T0, T4, T8, T12, T16, T20 coletas realizadas;
 Letras acima das barras: Teste de Tukey;
 C Irr: Controle Irrigado;
 C Par Est: Controle Parcialmente Estressado;
 14P: Parcialmente Estressado,
 326P: Parcialmente Estressado;
 164P: Parcialmente Estressado;
 312P: Parcialmente Estressado;

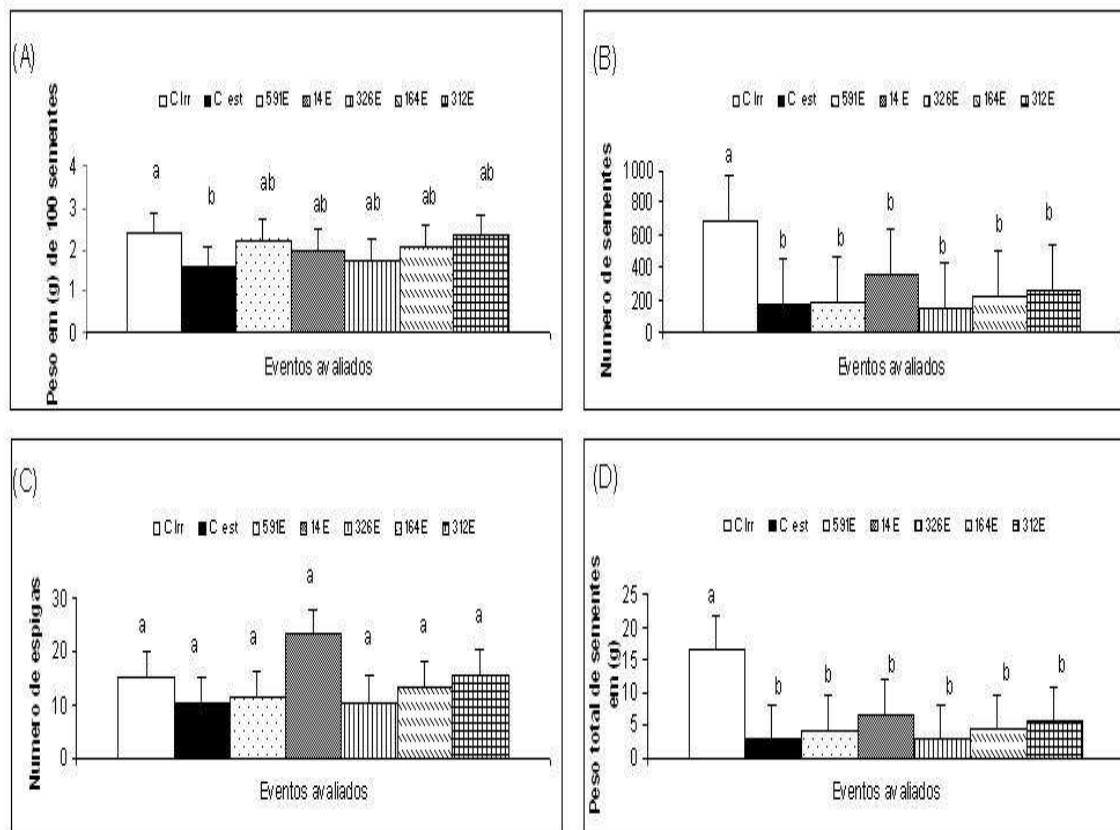
Figura 13. Conteúdo de MDA (Malondialdeído) em nmol/g de peso fresco mediante estresse hídrico parcial nos diferentes tempos avaliados.

Com 16 dias, apenas os eventos 164 e 312 apresentaram valores de MDA significativamente menores. As plantas controle estressado aumentaram seus valores de MDA sendo 6,97x maior comparado ao controle irrigado.

Após o 24º dia, os valores de MDA voltaram a aumentar, com exceção dos eventos 14 e 312 que apresentaram níveis de MDA inferiores e estatisticamente significativos quando comparados ao controle estressado e similares aos do controle irrigado. Somente as plantas controle parcialmente estressado mantiveram alto MDA, os demais eventos e controle irrigado apresentaram valores estatisticamente similares, embora numericamente diferentes. O evento 591 apresentou um aumento brusco de 35% em seu índice de MDA. Já, o evento 164 apresentou uma diminuição de apenas 15% em relação ao controle parcialmente estressado.

4.6 Índices de produção

Em condições de estresse severo, as plantas dos eventos transgênicos apresentaram maiores produções em valor numérico, embora não significativos estatisticamente, quando comparados com os controles submetidos a estresse severo e parcial (Figuras 14 e 15). O controle irrigado apresentou em média por planta: 15 espigas, 690 sementes, 2,3g para peso de 100 sementes e peso total de sementes por planta de g 16,5g. O controle estressado apresentou 10,2 espigas, 169 sementes, 1,5g para peso de 100 sementes e peso total de sementes de 3g. No estresse severo o evento que apresentou maior destaque para os índices produtivos foi o 14 com 23,2 espigas, 349,6 sementes, 1,9g para peso de 100 sementes e peso total de sementes de 6,5g. Produziu mais espigas porém, de menor peso. Outro evento que se destacou foi o 312 com 15,4 espigas, 255,2 sementes, 2,3g para peso de 100 sementes e peso total de sementes de 5,8g.



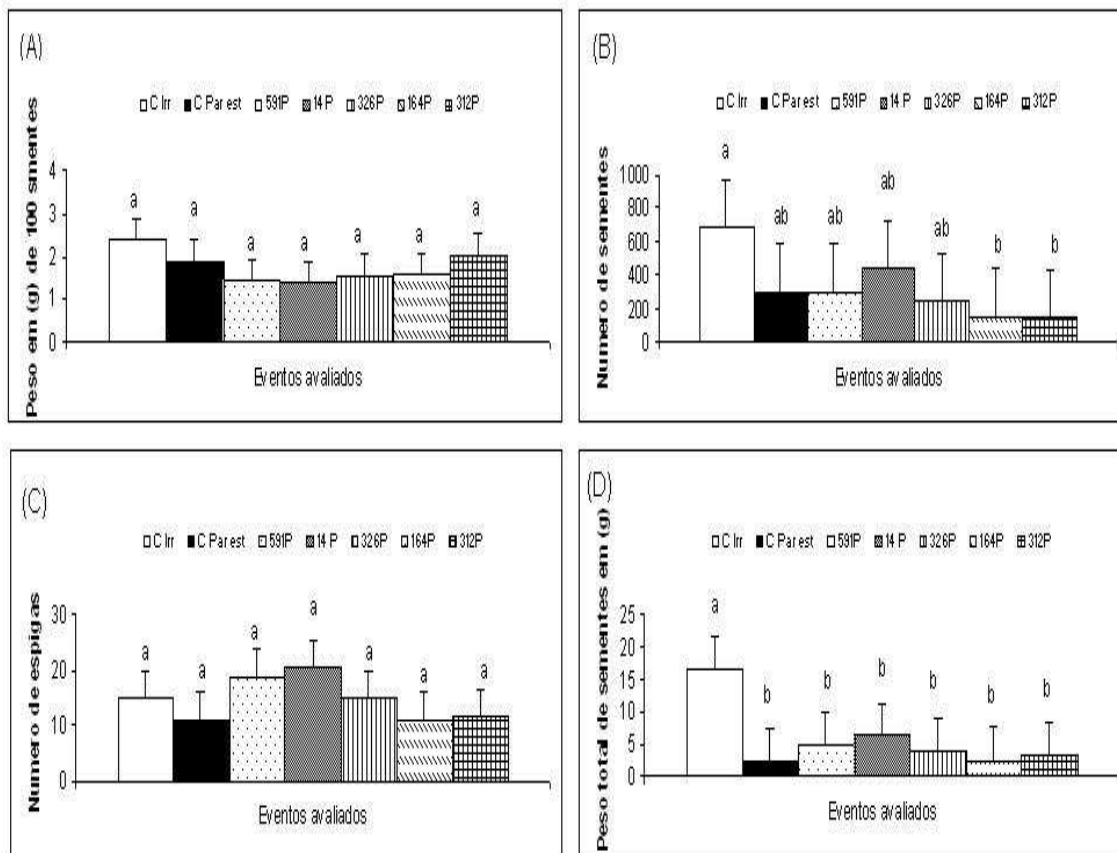
Legenda:

- (A) Peso de 100 sementes;
 - (B) Número de sementes;
 - (C) Número de espigas;
 - (D) Peso total de sementes;
- Letras acima das barras: Teste de Tukey;
 C Irr: Controle Irrigado;
 C Est: Controle Estressado;
 14E: Estressado;
 326E: Estressado;
 164E: Estressado;
 312E: Estressado.

Figura 14. Índices de produção das plantas dos diferentes eventos submetidos a estresse hídrico severo.

Similar á condição anterior, as plantas dos eventos transgênicos apresentaram maiores produções em valor numérico, embora não significativo estatisticamente, quando comparados com os controles submetidos a estresse parcial (Figura 15). O controle parcialmente estressado apresentou em média por planta: 11 espigas, 303,25 sementes, 1,8g para peso de 100 sementes e peso total de sementes de 2,19g. O evento que apresentou maior destaque para os índices produtivos foi o 14 gerando em média 20,5 espigas, 437,5 sementes, 1,3 g para

peso de 100 sementes e peso total de sementes de 6,3g. Outro evento que se destacou foi o 591 com 18,7 espigas, 295,75 sementes, 1,4g para peso de 100 sementes e peso total de sementes de 4,8g.



Legenda:

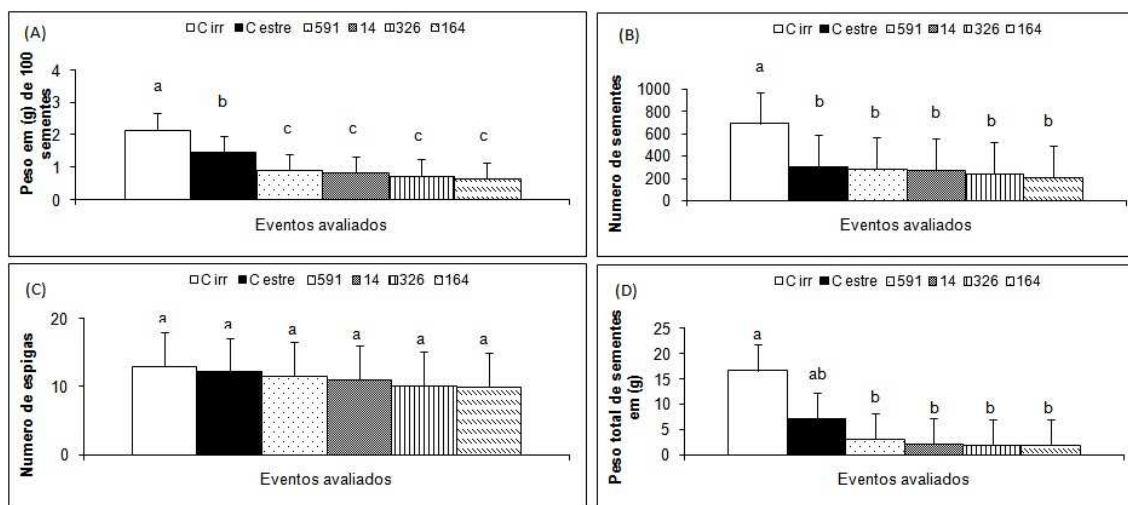
- (A) Peso de 100 sementes;
 - (B) Número de sementes;
 - (C) Número de espigas;
 - (D) Peso total de sementes;
- Letras acima das barras: Teste de Tukey;
 C Irr: Controle irrigado;
 C Par Est: Controle Parcialmente estressado;
 14P: Parcialmente Estressado;
 326P: Parcialmente Estressado;
 164P: Parcialmente Estressado;
 312P: Parcialmente Estressado.

Figura 15. Índices de produção das plantas dos diferentes eventos submetidos a estresse hídrico parcial.

Os resultados obtidos para o experimento em paralelo mostram similaridades nos índices de produção entre eventos e controles estressados (Figura 16). O controle irrigado

apresentou em média por planta: 15 espigas, 690 sementes, 2,3g para peso de 100 sementes e peso total de sementes de 16,5g. O controle estressado apresentou em média por planta: 11 espigas, 304 sementes, 1,4g para peso de 100 sementes e peso total de sementes de 7,1g.

Os eventos apresentaram menor número de espigas que ambos os controles embora não sendo estatisticamente significativo (Figura 16). Para o peso de 100 sementes o controle estressado foi o que apresentou melhor performance, se diferenciando estatisticamente de todos os eventos com 1,4g. Esta mesma tendência ocorreu no peso total, mas sem diferença significativa. Já para o número de sementes todos os eventos e o controle estressado apresentaram resultados similares não apresentando diferenças significativas.



Legenda:

- (A) Peso de 100 sementes;
- (B) Número de sementes;
- (C) Número de espigas;
- (D) Peso total de sementes;

Figura 16. Índices de produção das plantas dos diferentes eventos submetidos a estresse hídrico severo, mas sem o estresse físico da desfolha.

5 DISCUSSÃO

São escassos os trabalhos na literatura que relatam a performance de gerações avançadas de eventos transgênicos. O estudo da estabilidade de expressão do transgene e a sua produtividade são fundamentais para o lançamento de variedades comerciais transgênicas, principalmente quando o sistema de transformação genético usado foi a biobalística, que se caracteriza por inserir fragmentos gênicos sem o controle do número e da posição de inserção no genoma. (MLYNOROWA et al., 1996; ULKER et al., 1999; ANAND et al., 2003).

Está bem documentado na literatura que o estresse hídrico promove a perda de água celular ou estresse osmótico e que a capacidade de tolerância está relacionada com a manutenção da integridade celular para a manutenção do metabolismo, o que favoreceria às plantas a recuperação após o término do período do déficit hídrico, em condições de campo (OZDEN et al., 2008; SIMOVA-STODOVA et al., 2009)

O ajustamento osmótico é o principal componente da maquinaria fisiológica em resposta ao estresse hídrico (CHAVES et al., 2003). Os osmólitos incluem íons (K); pequenas moléculas como prolina, açúcares solúveis e outros. Na cultura do trigo, muitos trabalhos na literatura apontam a correlação positiva entre um aumento de prolina e resistência ao déficit hídrico (NAYYAN, 2003; ZHU et al., 2005). A prolina parece ter um papel fundamental na proteção ao dano oxidativo, resultante de um sistema anti-oxidante mais eficiente em que a prolina parece estar envolvida no seqüestro e inativação dos radicais livres e na proteção de enzimas antioxidantes (LUTTS, 1999; VENDRUSCOLO et al., 2007; OZDEN et al., 2008). Esta proteção manteria a célula intacta para quando a condição de água à campo fosse restabelecida, o que daria chances às plantas estressadas de recuperação ainda produzindo sementes.

Foi verificado em testes preliminares, que nenhuma planta controle cv CD200126 suportou mais que 8 dias de estresse hídrico severo, porém neste estudo pode-se observar a recuperação desta mesma cultivar após 16 dias de restrição hídrica. É fundamental para a acurácia dos dados, o estudo do impacto do estresse por restrição hídrica sobre as plantas em ciclo fenológico de importância econômica. LEMOS et al. (2008) demonstraram que os estádios de emborrachamento, espigamento e florescimento são os mais susceptíveis ao estresse hídrico e normalmente produzem maior conteúdo de prolina.

Neste experimento, foi aplicado um estresse de 16 dias iniciando na fase de emborrachamento e a partir desta data, foi realizada a reposição do potencial hídrico dos vasos para verificar o desempenho dos eventos avaliados quanto à produção e também para reproduzir condições próximas a de campo.

Os resultados permitem concluir que houve acréscimos consideráveis no conteúdo de prolina de todas as plantas dos eventos avaliados. No experimento onde o estresse severo foi aplicado, o início da percepção da falta de água e indução do gene *p5cs* iniciou-se a partir do 8º dia e alcançou os valores máximos no 12º de experimentação. Nesta avaliação, os percentuais de aumento do conteúdo de prolina foram: 52% (evento 591); 62% (evento 14); 49 % (evento 326) ; 60% (evento 312) e 33% (evento 164). Similar ao anterior, a condição de estresse hídrico parcial apresentou acréscimos substanciais à concentração de prolina: 200% (evento 591); 120% (evento 14); 6% (evento 326), 150% (evento 164) e 190% (evento 312). Os dados obtidos para o experimento com estresse parcial foram maiores em percentuais devido ao fato que os valores de prolina nas plantas controle diminuíram na ordem de 50% da avaliação do 12º dia para o 16º dia.

Uma possível explicação para os níveis menores de prolina nas plantas controle aos 16º dia de avaliação seria a possível migração da prolina para os tecidos reprodutivos, uma vez que a prolina está associada à morfogênese em diversas espécies (NANJO et al., 1999; IGARASHI et al., 2000). Também, alguns autores sugerem a presença de proteínas transportadoras de prolina (*AtProT1* e *AtProT2*) que poderiam fazer a remoção da prolina sintetizada na folha e raiz para órgãos reprodutivos em que altos níveis de prolina foram encontrados no estágio de espigamento (RENTSCH et al., 1996).

Os elevados índices de prolina encontrados em plantas controle submetidas à restrição hídrica poderiam ser explicados pelo fato de que, sob influência do estresse, a síntese de proteínas é inibida e a degradação de proteínas é acelerada, o que leva a um acúmulo de aminoácidos e aminas (FUMIS e PEDRAS, 2002).

OZDEN et al (2008) relatam que altos níveis de prolina reduziram os níveis de MDA e a porcentagem de membranas celulares danificadas. A prolina está associada ao desenvolvimento na planta de um papel adaptativo mediando ajustes osmóticos e protegendo estruturas subcelulares na plantas estressadas. Os dados obtidos permitem concluir que sob restrição hídrica severa, os eventos transgênicos aumentaram o conteúdo de prolina, comparativamente às plantas controle estressadas evidenciando que o transgene foi expresso. Os acréscimos foram da ordem de: 1,62x (evento 14); 1,52x (evento 591); 1,49x (evento 326); 1,6x (evento 164) e 1,16x (evento 312).

A aplicação do estresse parcial até o 8º dia, não permitiu uma diferenciação significativa das plantas transgênicas com o controle estressado nas características fisiológicas avaliadas, possivelmente sendo explicada pelo fato do transgene apresentar um promotor estresse induzido (*aipc*) que em estresse severo iniciou a percepção do estresse apenas com 8 dias (MOLINARI et al., 2004, VENDRUSCOLO et al., 2007). Os dados permitem concluir que a percepção do estresse iniciou a partir do 8º dia, sendo que a expressão máxima da prolina aconteceu no 12º dia de experimentação. Já no estresse parcial, a expressão máxima de prolina ocorreu a partir do 16º dia, uma vez que o estresse foi mais brando.

Uma das mais importantes modificações bioquímicas em plantas sujeitas a estresses abióticos é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (AHMED et al., 2009). Sob restrição hídrica, há redução na taxa fotossintética devido ao fechamento dos estômatos e, com a continuação da falta de água e constante captura de luz, a fixação fotossintética de CO₂ é limitada, originando um acúmulo de elétrons (ASHRAF et al., 2008; MUNNS & TESTER, 2008). As EROs danificariam as membranas celulares pela peroxidação e reesterificação dos ácidos graxos da membrana.

Diversos relatos na literatura demonstram que alto conteúdo de prolina em células previniria o estresse oxidativo causado pela presença das EROs consequentes do estresse hídrico (HONG-BO et al., 2006; HOQUE et al., 2007; AHMAD et al., 2008; BHATNAGAR et al., 2009). Os resultados obtidos demonstram uma tendência nos eventos de alto conteúdo de prolina e baixos níveis de MDA principalmente em condições de estresse hídrico severo. Esta condição se traduziu em uma maior manutenção da integridade celular (IEM) dos eventos avaliados comparados ao controle estressado severamente e parcialmente.

Neste experimento, durante aplicação da restrição hídrica severa e parcial, as plantas dos eventos apresentaram menores conteúdos de MDA, o que sugere uma melhor proteção ao dano oxidativo, resultante de um sistema mais eficiente, em que a superexpressão da prolina poderiam estar envolvidos no seqüestro e na inativação dos radicais livres e na proteção de enzimas antioxidantes, principalmente a catalase e a peroxidase (LUTTS, GUERRIE, 1995; HOQUE et al., 2007). Segundo SIMOVA-STODOVA et al. (2009), no estresse parcial, a imposição gradual de déficit hídrico permite às plantas se acomodarem ao estresse e desenvolver mecanismos de defesa para resistir a este estresse.

As diferenças observadas nos índices de estabilidade de membrana (IEM) entre plantas transgênicas e controle ocorreram somente no 16º dia de aplicação do estresse hídrico severo e parcial. As plantas controle estressadas obtiveram IEMs com média de 40% e as plantas transgênicas apresentaram IEMs superiores (60 a 80%), principalmente plantas do evento 312

que sob restrição hídrica parcial, demonstraram uma maior habilidade em manter a integridade celular. Os acréscimos nos valores dos índices de integridade celular das plantas transgênicas dos diferentes eventos, comparados aos das plantas controle parcialmente estressadas foram: 1,5x (evento 591); 1,48x (evento 14); 1,46x (evento 326); 1,35x (evento 164) e 0,81x (evento 312).

Uma possível explicação para os maiores percentuais de MDA nas fases de florescimento e enchimento de grãos, comparados às outras fases poderia ser explicado pela ausência de prolina em função da sua possível migração para tecidos reprodutivos e com isto, as células apresentariam maiores danos aos estresses oxidativos, consequência do déficit hídrico (OZDEN et al., 2008).

Os índices produtivos apontam para a redução de produção sob condições de déficit hídrico. Ao compararmos os pesos totais de sementes dos controles estressado e parcialmente estressado, estes, apresentaram uma redução de 7x e 5x respectivamente, comparados ao controle irrigado. LEMOS et al, 2008 observaram que a seca aplicada no emborrachamento com plantas CD200126 deram uma diminuição no peso de 100 sementes no emborrachamento da ordem de 51,8% e no espigamento o decréscimo foi de 80% aplicando-se apenas 8 dias de estresse hídrico severo.

Os resultados obtidos apontam os eventos 312 e 14 como os de melhores performances quando submetido ao estresse hídrico severo. O evento 14 aumentou em 1,5x o número de espigas; 106% número de sementes, 126% peso de 100 sementes e 118 % peso total de sementes comparados ao controle estressado, o que poderia ser extrapolado para uma maior produtividade deste evento em condições de campo. O evento 312 apresentou um acréscimo de 1,5x o número de espigas; 51% número de sementes, 50% peso de 100 sementes e 94% peso total de sementes. Outros eventos também tiveram acréscimos substanciais para número de espigas e peso total de sementes: 0,1x e 43% (evento 591); 0,09x e 47% (evento 164).

Quando o estresse hídrico aplicado foi parcial, os eventos que mais se destacaram foram o evento 14 com acréscimos de 1,5x número de espigas; 57% número de sementes e 187% peso total de sementes e o 591 com acréscimos de 1,7 x número de espigas; 6% número de sementes e 120% peso total de sementes.

Os dados do evento 312 foram considerados como perdidos quando o estresse severo foi aplicado (sem desfolha das plantas) pois, o mesmo, não produziu sementes/espigas em algumas plantas.

Em relação aos parâmetros produtivos avaliados, embora algumas diferenças numericamente tenham sido até maiores do que 100%, os resultados não apontam para

diferenças estatísticas significativas entre plantas dos diferentes eventos e controle estressado nas três condições avaliadas (desfolha estressada, desfolha parcialmente estressada e sem desfolha). A possível explicação para estes resultados seria a grande variabilidade dentro dos tratamentos, e o alto erro experimental, devido à avaliação de plantas individuais. A avaliação de plantas individuais é muito sujeita a erro, pois há muita variação entre plantas do mesmo tratamento.

Os dados experimentais dão indícios de que a aplicação da transgenia do gene *p5cs* seja potencial para obtenção de plantas tolerantes à seca, pois a tolerância a estresses abióticos é dependente de um complexo de interações entre vários produtos gênicos, onde o acúmulo de osmólitos tem sido proposto como uma estratégia para aumentar ao menos um aspecto da tolerância para estas adversidades, o que pode promover profundos benefícios econômicos na agricultura.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- 1- Houveram diferenças nas respostas fisiológicas e produtivas dos cinco eventos avaliados sob condição de estresse hídrico severo e estresse hídrico parcial.
- 2- As plantas dos eventos avaliados sob condições de estresse severo e parcial apresentaram conteúdos maiores de prolina (1,16x a 1,62x mais), níveis menores de MDA e consequentemente os IEMs destas plantas foram maiores por demonstrarem um mecanismo mais eficiente de proteção das membranas celulares contra o estresse oxidativo.
- 3- A percepção do estresse severo ocorreu a partir do 8º dia de restrição hídrica severa, enquanto que na restrição hídrica parcial, o início da percepção ocorreu após o 12º dia.
- 4- Os resultados obtidos para os índices de produção foram similares entre plantas transgênicas dos diferentes eventos e controles sem transformação estressados
- 5- As avaliações do efeito do estresse hídrico sob diferentes condições: desfolha estressada, desfolha parcialmente estressada e sem desfolha sobre os índices de produção não apresentaram diferenças significativas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIA; HAYASHI, H.; CHEN, T-H. H; MURATA, N. Transformation with a gene for choline oxidase enhancer the cold tolerance of *Arabidopsis* during germination and early growth. **Plant Cell Envir.** 21:232-239, 1993

AHMAD . P.; JOHN, R.; SARWAT. M; UMAR . S.; Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. Under salt stress. **International Journal of plant Production** 2, October 2008. ISSN: 1735-6814 (print), 1735-8043 (online).

ANAND A.;TRICK, N.H.; GILL,B.S.; MUTHUKRISHNAN,S. Stable transgene expression and random silencing in wheat. **Plant Biotechnology Journal** 1:241-251, 2003.

ANOOP,N. & GUPTA, A.K. Transgenic indica cv IR –50 overexpressing *Vigna aconitifolia* pyrroline-carboxylate-synthetase cDNA shows tolerance to high salt. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, 12:109-116, 2003.

ASHRAF, M.; MCNEILLY, T. Variability in Salt Tolerance of Nine Spring Wheat Cultivars. **Journal of Agronomy and Crop Science** Volume 160 Issue 1, Pages 14 – 21 Published Online: 22 Apr 2008.

BABU, M. M.- LUSCOMBE, N. M.- ARAVIND, L.- GERTEIN, M.; TEICHMANN, S. A. Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. **Current Opinion** in Structural Biology Volume 14, Issue 3, Pages 283-291 June 2004, doi:10.1016/j.sbi.2004.05.004

BAJAJ, S; TARGOLLI, J.; LIU, L.F.; HO, T-H. D.; WU, R. Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. **Molecular Breeding**. 5: 493-503, 1999.

BALLANTYNE, J.S. & CHAMBERLIN, M.E. Regulation of cellular amino acid levels. IN: **Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation** (K. Strange ed) CRC Press, Boca Raton, pp 111-122, 1994.

BAULCOMBE, D. RNA silencing. **Current Opinion in Biology**. 12(3), R82-R84, 2002.

BAULCOMBE, D.C and ENGLISH, J.J. Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. **Current. Opinion. Biotechnol.** 7:173-180, 1993.

BATES, L.S.; WALDRAN,R.P.; TEARE,I.D. Rapid determination of free proline for water studies. **Plant Soil**, 39: 205-208, 1973.

BELHASSEN, E.; THIS, D ; MONNEVEUX, P. Adapting genetic face constraints secheresse aus. **Cahiers Agricultures**, 4: 251-261, 1995.

BELLINGER, Y. & LARHER, F. Proline accumulation in higher plants: a redox buffer. **Plant Physiology**, 6: 23-27, 1987.

BELLINGER, Y; BENSAOUD, A.and LARHER, F. Physiological significance of proline accumulation, a trait of use to breeding for stress tolerance. In: ACEVEDO, E.; CONESA, A.P. AND SRIVASTAVA, J.P..(Eds.) **Plant Physiology**- breeding of winter cereals for stressed mediterranean environments. INRA, 449-458, 1991.

BHATNAGAR MATHUR, P.; DEVI, M.J.; VALDEZ,V.; SHARMA, K. K. Differential antioxidative responses in transgenic peanut bear no relationship to their superior transpiration efficiency under drought stress. **Journal of Plant Physiology**. Volume 166, Issue 11, Pages 1207-1217, 15 July 2009 doi:10.1016/j.jplph.2009.01.001 |

BLUM, A. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. **Plant Growth Regulation**, 20: 135-148, 1996.

BORGO, L. **Estudos fisiológicos e moleculares de plantas transgênicas de tabaco** (*Nicotiana tabacum*) para tolerância ao déficit hídrico. Londrina, PR, 2005. Universidade Estadual de Londrina, Tese Mestrado.

BOLANOS, J.; EDMEADES, G. O. Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. II. Responses in reproductive behavior. **Field Crops Research** Volume 31, Issues 3-4, Pages 253-268, 15 January 1993. doi:10.1016/0378-4290(93)90065.

BOREM, A. Escape gênico & transgênicos: **Aspetos moleculares dos transgenes** -Viçosa: UFV.2001 pg 72.

BOHOROVA, N., FENNELL, S., McLEAN S., PELLEGRINESCHI, A.; HOISINGTON, D. Laboratory protocols: CIMMYT **Applied Genetic Engineering Laboratory**. Mexico D.F.: CIMMYT, 139P, 1999.

BOYER, J. S.; WESTGATE, M. E. Grain yields with limited water. **Journal of Experimental Botany** 55(407):2385-2394, 2004. doi:10.1093/jxb/erh219

CAMARA, T.R; L. WILLADINO, AM TORNÉ, MA SANTOS 2000 – Efeito do estresse salino e da prolina exógena em calos de milho **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, 12(2):146-155, 2000.

CATTIVELLI, L.; RIZZA,F.; BADECK, F-W.; MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A. M.; FRANCA, E.; MARE, C.; TONDELLI, A.; STANCA, A. M. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research** Volume 105, Issues 1-2, Pages 1-14, 2 January 2008. doi:10.1016/j.fcr.2007.07.004.

CALDEIRA, M. T. M. ., LIMA, V. L. A., SEKI, H.A., RUMJANEK, F. D.Trigo. Diversidade de trigos, tipificação de farinhas e genotipagem. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** (on line), v. 16, p.44-48, 1999.

CARNEIRO, C. E. A.; MOLINARI, H. B.; ANDRADE, G. A; PEREIRA, F. P; VIEIRA, L. G. E.; Produção de prolina e suscetibilidade ao glufosinato de amônio em plantas transgênicas de citrumelo Swingle. **Pesquisa agropec. brasileira**. vol.41 no.5 Brasília May 2006 doi: 10.1590/S0100-204X20060005000

CLAUSSEN, W. Proline as a measure of stress in tomato plants. **Plant Science** 168:241-248, 2005.

CHEN, T.H. H. & MURATA, N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betanes and other compatible solutes.**Current Opnion in Plant Biology** 5: 250-257, 2002.

CHANDLER, V.; & VAUCHERET, O. Gene activation and gene silencing. **Plant Physiology**.125,145-148, 2001.

CHRISTOU, P. Genetic-Transformation of crop plants using microprojectile bombardment. **Plant Journal**. 2: 275-281, 1992.

CHAVES, M.M.; OLIVEIRA M.M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits:prospects for water saving agriculture. **Journal of Experimental botany** 55:2365-2384, 2003.

CIAIS, M.; REICHSTEIN, N.; VIOVY, A.; GRANIER, J.; OGE'E, V.; ALLARD, M.; AUBINET, N.; BUCHMANN,CHR.; BERNHOFER, A.; CARRARA, F. CHEVALLIER, N.; DE NOBLET, A.; D. FRIEND, P.; FRIEDLINGSTEIN, T.; GRU'NWALD,B.; HEINESCH, P.; KERONEN, A.; KNOHL, G.; KRINNER, D. LOUSTAU, G.; MANCA, G.; MATTEUCCI, F. MIGLIETTA,J.; M. OURCIVAL, D.; PAPALE, K.; PILEGAARD, S.; RAMBAL, G.; SEUFERT, J. F.; SOUSSANA, M. J.; SANZ, E. D.; SCHULZE,T.; VESALA

& R. VALENTINI. Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought. **Nature** in 2003 Vol 437|22 September 2005|doi:10.1038/nature03972

COSTA, M. G. C.; NOGUEIRA, F. T. S.; OTONI, W. C.; BROMMONSCHENKEL, S. H. Transformação genética de cultivares de tomateiro industrial mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal.**, 12(2): 107-118, 2000.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em <http://www.conab.gov.br/cgi-bin/htsearch?exclude=viaconab;config=htdig;method=and;format=builtin-long;sort=score;words=trigo%202008;page=2>. Acesso Jan.2010.

CUNHA, G. R. **Buscando a elevação do rendimento de grãos em trigo**. Passo Fundo: Embrapatrigo., 7 p. html. ISSN-1518-6512 Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do50.htm Acesso em Nov.2009.

CROSSWAY, A.; OAKES, J. V.; IRVINE, J.M.; WARD, B.; KNAUF, V.C.; SHEWMAKER, C.K. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. **Mol. Gen. Gent.** 202:179-185, 1986.

DATTA, S.K., PETERHANS, A., DATTA, K. AND POTRYKUS, I. Genetically engineered fertile indica-rice recovered from protoplast. **Bio/technol.** 8:76-740, 1990.

DALMAY T, HAMILTON A, RUDD S, ANGELL S, BAULCOMBE DC. An RNA-dependent RNA polymerase in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. **Cell** 2000;101:543-53.

DELAUNEY, A.J. & VERMA, D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **Plant Journal** 4: 213-223, 1993.

DÍAZ, P.; BORSANI, O; MONZA, J. Acumulacion de prolina en plantas en respuesta al estrés osmotico. **Agrociencia** 3: 1-10, 1999.

DIBAX, R. ; DESCHAMPS, C. ; BESPALHOK, J. ; VIEIRA, L. G. E. ; QUOIRIN, M. ; CAMPOS, M. ; MOLINARI, H . Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Eucalyptus saligna* with p5cs gene.. **Biologia Plantarum**, 2009. ; ISSN/ISBN: 00063134.

DOYLE, J. J. and J. L. DOYLE. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. **Focus** 12:13-15., 1990.

DO"RFFLING, K; DO"RFFLING H; LUCK, E. Improved frost tolerance and winter hardiness in proline overaccumulating winter mutants obtained by in vitro-selection is associated with increased carbohydrate, soluble protein and abscísico acid (ABA) levels. Received: 14 January 2008 / Accepted: 15 July 2008 / Published online: 31 July 2008 **Springer Science+Business** Media B.V. 2008 Euphytica (2009) 165:545–556 DOI 10.1007/s10681-008-9777-3

ENGLISH, J.J & BAULCOMBE, D.C. Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. **Current Opinion in Biotechnology**. 7:173-180,1996.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA -EMBRAPA TRIGO. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.htm>. Acesso Jan. 2010.

ERDEI, L.; TARI, I.; CSISZAR J.; PECSVARADI, A.; HORVATH, F.; SZABO, M.; ORDOG, M.; CSEUZ, L.; ZHIPONOVA, M.; SZILAK, L.; GYORGYEY, J. Proceedings of the 7 Hungarian Congress on **Physiology**, volume 46(3-4):63-65, 2002.

FARIAS, J. R. B.; NEPONUCENO, A. L.; NEURMAIER, N. Rendimento de entipos semiprecoce de soja submetidos ou não a irrigação. **Rev. Bras. de fisioloia vegetal**, 5.57, 1993.

FAGARD, M. & VAUCHERET, H. (Trans gene silencing in plants) : How many mechanisms? Annual Review of **Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 51:167-194, 2000.

FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, Driver SE, Mello

CC. Potent and specific genetic interference by doublestranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature** 1998; 391(6669):806-11.

FLOWERS, T.; KOYAMA, M.; FLOWERS, S.; SUDHAKAR, C.; SINGH K.; YEO A. QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. **Journal of Experimental Botany** 51:99-106, 2000.

FORNASIERI FILHO, DOMINGOS. **Manual da Cultura do Trigo**. Jaboticabal: Funep, 2008 pg 80-89 cap 1;

FUKUTAKU, Y. & YAMADA, Y. Sources of proline nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max*) II. Fate of ¹⁵N - labeled protein. **Physiologia Plantarum**. 61:622-628, 1984.

FUMIS, T.T.; PEDRAS, J.F. Variação nos níveis de prolina, diamina e poliaminas em cultivares de trigo submetidas a déficits hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.4, p.449-453, 2002.

FROMM, M., TAYLOR, L.P. ; WALBOT, V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. **Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.** 82:5824-5828, 1985.

GLOMBITZA,S.; DUBUIS,P.;THULKE, O.; WELZL, G.; BOVET,L.; GOTZ, M.; AFFENZELLER, M.; GEIST, B.; HEHN, A.; ASNAGHI,C.; ERNST, D.; SEIDLITZ, H.; Gundlach1, H.; MAYER, K.; MARTIOIA, E.; WERCK-REICHHART, D.; MAUCH, F and SCHAFFNER, A. Crosstalk and differential response to abiotic and biotic stressors reflected at the transcriptional level of effector genes from secondary metabolism. **Plant Molecular Biology** Publisher Springer Netherlands ISSN 0167-4412 (Print) 1573-5028 (Online) Issue Volume 54, Number 6 / April, 2004 DOI 10.1007/s11103-004-0274-3 Pages 817-835.

GREENWAY, H. and MUNS, R. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. Annual Review of **Plant Physiology**, 31:149-190, 1980.

GOPFER, H.; ROSSETTI, L.A.; SOUZA, J. Eventos generalizados e seguridade agrícola. Brasília: **IPEA**, Ministério do planejamento. 78p, 1993.

GROVER, A.; KAPOOR, A; LAKSHMI, O.S.; AGARWAL, S.; SAHI, C.; AGARWAL, M.; DUBEY, I.Understanding molecular alphabets of the plant abiotic stress responses. **Current Science**, 80:206-216, 2001.

GUY, C.L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. Annual Review of **Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 41:187-223,1990.

HANDA, S.; HANDA, A.K.; HASEGAWA, P.M. and BRESSAN, R. Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. **Plant Physiology**, 80:938-945, 1986.

HARE, P.D. & CRESS, W.A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, 21:79-102,1997.

HARE, P.D.; CRESS, W.A.; VAN STANDEN, J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant Cell Environment**. 21: 535-553, 1998.

HARE, P.D.; CRESS, W.A.; VAN STANDEN, J. Proline synthesis and degradation: a model for elucidating stress related signal transduction. **Journal of Experimental Botany**. 50: 413-434, 1999.

HAYAFUNE M, MIYANO-KUROSAKI N, TAKAKU H, PARK WS. Silencing of HIV-1 gene expression by siRNAs in transduced cells *Nucleotides Nucleic Acids*;25(7):795–9, 2006.

HAN, K. & HWANG, C.H. Salt tolerance enhanced by transformation of a p5cs gene in carrot. **Journal of Plant Biotechnology**, 5:149-153, 2003.

HMIDA-SAYARI, A; BIUZID, R.G.; BIDONI, A.; JAOUA, L.; SAVOURÉ, A.; JAOUA, S. Overexpression of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. **Plant Science** . 2005.

HONG, Z.; LAKKINENI, K.; ZHANG, Z.; VERMA, D.P.S. Removal of the feedback inhibition of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increase proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology**. 122: 1129-1136, 2000.

HONG-BO, S., CHEN XIAO-YAND, G, CHU LI-YEC, ZHAO XI-NINGB, WU GANGH, YUAN YONG-BINGE, ZHAO CHANG-XINGE and HU ZAN-MIN. Investigation on the relationship of proline with wheat anti-drought under soil water deficits. **Science Direct** doi:10.1016/j.colsurfb.2006.08.008 Elsevier.

HOLMSTRON, K. O., SOMERSALO, S. ; MANDAL, A.; PALVA, T. E. ; WELIN, B. Improved toleranc to salinity end low temperature in transgenic tobacco producing glicine betaine **Journal of Experimental Botany** 51: 177-185, 2000.

HOQUE, M. A.; OKUMAA,E.; BANUA, M. N. A.; NAKAMURA, Y.; SHIMOISHIA, Y. and MURATA, Y. Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. **Journal of Plant Physiology** Volume 164, Issue 5, Pages 553-561, 3 May 2007. doi:10.1016/j.jplph.2006.03.010.

HU, C-A. A.; DELAUNEY, A.J.; VERMA, D.P.S. A bifunctional enzyme Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase catalyses the first two steps of proline biosynthesis in plants *Proceedings. National. Academy of. Science. USA*, 89: 9354-9358, 1992.

HUBNER, O. **Comparativos de área, produção, produtividade**, safras 2002/03 . Disponível em: http://www.pr.gov.br/seab/deral/caps_0203_xls., 2003. Acesso Nov. 2008.

HUR, J., HONG JONG, K., NA, G. Stress inducible *Osp5cs2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice. **Plant Science**, 167:417-426, 2004.

ÍBA, K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant biology*, 55:225-245., 2002.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>. Acesso Jan. 2010.

IGLESIAS, V.A. Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. **Plant cell**. 9:1251-1264, 1997.

IGARASHI, Y.; YOSHIBA, Y.; SANADA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; WADA, K.; SHINOZAKI, K. Characterization of the gene for delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. **Plant Molecular Biology** 33:857–865, 2000.

IYER, L. M.; KUMPATLA, S. P. CHANDRASEKHARAN, M. B.; HALL, T. C. Transgene silencing in monocots. **Plant Molecular Biology** 43 323-346.2000.

JALEEL, C.A. ; SANKAR, B ; KISHOREKUMAR, A; PANNEERSELVAM, R. Calcium chloride effects on salinity-induced oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus*. Académie des sciences. **Published by Elsevier Masson SAS**. doi:10.1016/j.crv.2007.07.002. 2007.

JONES, H. D. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *Journal of Cereal Science*. 41: 137-147, 2005.

JONES, L., HAMILTON, A.J, VOINNET, O., THOMAS, C.L, MAULE, A.J. and BAULCOMBE, D.C. RNA-DNA interactions and DNAmethylation in post-transcriptional gene silencing. **Plant Cell** 11:2291-2302, 1999.

KADO, C.I. Agrobacterium-mediated horizontal gene transfer. **Genet. Eng.**20: 1-24, 1998.

KAYA, C. ; LEVENT, A. T , ASHRAF, M. ; ALTUNLU, H. Improved salt tolerance of melon (*Cucumis melo* L.) by the addition of proline and potassium nitrate. **Elsevier B.V. All rights reserved**, 2006. doi:10.1016/j.envexpbot.2006.12.008

KANASHIRO, C.H; VÁSQUEZ, C.C; LACLETTE, E.I; ESTRELA, L.H; SIMPSON, J. Analysis of Gene Expression and Physiological Responses in Three Mexican Maize Landraces under Drought Stress and Recovery Irrigation. *PLoS ONE* 4(10): e7531. doi:10.1371/**journal.pone**.000753, 2009.

KIRIGWI, F.M.; GINKEL, M.; TRETOWAN, R.; SEARS, R.G.; RAJARAM,S.; PAULSEN,G.M. Evaluation of selection strategies for wheat adaptation across water regimes. **Euphytica**. 135:361-371, 2004.

KISHOR, P.B.K.; HONG, Z.; MIAO, G.H.; HU, C.A; VERMA, D.P.S. Overexpression of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and helps maintain osmotic potential in transgenic plants during stress. **Plant Physiol**. 108: 1387-1394, 1995.

KISHOR, P.B.K.; SANGAM S.; AMRUTHA, R.N.; LAXMI, P.S.; NAIDU, K.R.; RAO, K.S.; RAO, S.; REDDY, K.J.; THERIAPPAN, P.;SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current. Science**. 88: 424-438, 2005.

KOHLI, A. ; RICHARD, M.; ABRANCHES, R; WEGEL, E; STORGER, E.; CHRISTOU, P. Transgenic integration organization and interaction in plants. **Plant Molecular Biology** 52: 247-258, 2003.

KOHL, D.; SCHUBEERT, K.; CARTER, M.; HAGENDORN, C.; SHEARER, G. Proline metabolism in N₂-fixing root nodules: energy transfer and regulation of purine synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 85:2036-2040, 1988.

KONSTANTINOVA, T.; PARVANOVA, D.; ATANASSOV, A.; DJILIANOV, D. Freezing tolerant tobacco transformed to accumulate osmoprotectants. **Plant Science**,163:157-164, 2002.

KOOKE, L.; STEELE, S. H.; BARCELO, P.; SHEWRY,P. R.; LAZZERI, P. A. 2002. Transgene inheritance, segregation and expression in bread wheat. **Euphytica** 129:301,2003.

KOOTER, J.M.; MATZKE, M.A.; MEYER, P. Listening to the silent genes:Transgene silencing, gene regulation and pathogen control. Trends in **Plant Science**, v. 4, p. 340-347, 1999.

KUMAR, S and FLADUNG, M. Gene stability in transgenic aspen (populus). II. Molecular characterization of variable expression of transgene in wild and hybrid aspen. **Plant** 213:731-740, 2001.

KYOZUKA, J.; FUJIMOTO, H., IZAWA, T.; SHIMAMOTO, K. Anaerobic induction and tissue-specific expression of maize Adh1 promoter in transgenic rice plants and their progeny. **Molecular Genomics and Genetics**, 228:40-48, 1991.

LAROSA, P.C.; RHODES, D.; RHODES, J.C.; BRESSAN, R.A; CSONKA, L.N. Elevated accumulation of proline in NaCl-adapted tobacco cells is not due to altered Δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase. **Plant Physiol.** 96:245-250, 1991.

LEMOS J. **Avaliação fisiológica do estresse hídrico em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) em diferentes fases do ciclo fenológico.** Trabalho de conclusão de curso. Curso de Especialização Biologia Molecular e Biotecnologia aplicada à agroindústria. UFPR-Campus Palotina, 2008.

LIMIN, A.E. & FOWLEL, D.B. Morphological and cytological characteres associated with low temperature tolerance in wheat. **Canadian Journal of Plants Science**, 80:687-692, 2000.

LOW, P.S. 1985. Molecular basis of the biological compability of nature's osmolytes. IN: Transport Processes, Ion and Osmoregulation (R. Gilles, M. Gilles - Baillien eds) **SpringerVerlag**, Berlim pp 469-477.

LUTTS, S.; MAYERUS, V.; KINET, J.M. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oriza sativa*) seedlings. **Physiology. Plantarum** 105: 450-458, 1999.

LUTTS, S.; GUERRIER, G. Peroxidase activities of two rice cultivars differing in salinity as affected by proline and NaCl. **Biologia Plantarum**, v.37, p.577-586, 1995.

MAIA, P.S.P.; NETO, C.F.D.; CASTRO, D.S; FREITAS, J. M. N; LOBATO, A. K. S; COSTA, R. C. L. Conteudo relativo d' água, teor de prolina e carbohidratos soluveis totais em folha de duas cultivares de milho submetidas a estress hídrico. **Revista. Brasileira. Biociência**, Porto Alegre, V. S, supl 2, p. 918-920, jull.2007.

MAGGIO, A.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M.; LOCY, R.D. Moderately increased constitutive proline does not alter osmotic stress tolerance. **Physiology. Plant.** 101: 240-246, 1997.

MALLORY, A.C.; ELY, L.; TRENT, H.S.; MARATHE, R.; ANANDALAKSHMI, R.; FAGARD, M.; VAUCHERET, H.; PRUSS, G.; BOWMAN, L.; VANCE, V.B. HC.-Pro supression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. **Plant Cell**, v. 13, p. 571-583, 2001.

MATHUR, P. BHATNAGAR., V. VADEZ., M. JYOSTNA DEVI., M. LAVANYA., G. VANI., K. K. SHARMA (&) International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Genetic engineering of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with the P5CSF129A gene for osmoregulation with implications on drought tolerance Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, **India Mol Breeding** (2009) 23:591–606 DOI 10.1007/s11032-009-9258-y.

MATYSIK, J.; ALIA; BHALU, B.; MOHANTY, P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. . **Current Science**. 82,5,525-532, 2002.

MATZKE, M.A.; MATZKE, A. J. M. Gene interactions and epigenetic variation in transgenic plant. **Developmental Genetics**. 11:214-223,1990.

MATZKE, M.A.; MATZKE, A. J. M.; PRUSS, G.; VANCE, V. RNA-based silencing strategies in plants. **Current Opinion in Genetics and Development**. 11:221-227, 2001.

MENESES, C. H. S. G., LIMA, L. H. G. M., LIMA M. M. A., VIDAL, M. S. Aspectos genéticos e moleculares de plantas submetidas ao déficit hídrico. **Revista Brasileira. Oleaginosas e fibrosas.**, v.10, n.1/2, p.1039-1072, jan./ago 2006.

MEYER, P. & SAEDLER, H. Hologly-dependent gene silencing in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 47: 23-48, 1996.

MILNER-WHITE, E.J.; BELL, L.; MACCALUM, P. .Amino acids compounds **Journal of Molecular Biology**. 228:725-734, 1982.

MLYNAROVAI, L.; KEIZER L.C.P.; STIEKEMA, W.J.; NAP, J.P. Approaching the low limits of transgene variability **The Plant cell** 14:129-135, 1996.

MISQUITTA, L.; PATERSON, B.M. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-I): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 1451-1456, 1999.

MOLINARI, H.B.C.; MARUR, C.J.; BESPALHOK FILHO, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PILEGGI, M.; MELKJUNIOR, R.P.; PEAR TREE, L.F.P.; VIEIRA, L.C.G. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb x *Poncirus trifoliata* L.Raf) overproducing proline. **Plant Science**. 167: 1375-1381, 2004.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, J. C.; DAROS, E.; CAMPOS, M. K. F.; CARVALHO, J. F. R. P.; FILHO, J. C B.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L.G .E. Evaluation the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum spp.*):osmotic adjustment, chlorophyll fluorence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum** 130:218229, 2007.

MONQUERO P. A. Pantas transgênicas resistentes aos herbicidas:situação e perspectivas. **Braganta**, Campinas, v.64, n.4, p517-531, 2005.

MORGAN, J. M. Osmoregulation and water stress in higher plants. Annual Review. **Plant Physiology**. 35: 299-315, 1994.

MOURRAIN, P; BEELIN, C.; ELMAYAN, T.; FEUERBACH, F.; GODON, C., MOEREL, J.; JOUETTE, D.; LACOMBE, A.; NIKIES, S.; PICAULT, N.; REMOUQUE, K.; SANTAL, M.; VOT.; VAUCHERET, H. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. **Plant Cell**. 101, 533-542, 2000.

MLOTSHWA, S.; VOINNET, O.; METTE, M. F; MATZKE, M.; VAUCHERET, H.; DING, S.; PRUS, G.; VANCE, V. RNA silencing and the mobile silencing signal. **Plant Cell**. 289-301, 2002.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. Annual Review of **Plant Biology** Vol. 59: 651-681 (Vol June 2008) (doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911).

NAN, R.; CARMAN, J. G. ; SALISBURY, F. B. Water stress, CO₂ and photoperiod influence hormone levels in wheat. **Journal of Plant Physiology**, 159:307,312, 2002.

NANJO, T., KOBAYASHI, M., YOSHIBA, Y., SANADA, Y., WADA, K., TSUKAYA, H., KAKUBARI, Y., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic Arabidopsis thaliana. **Plant Journal**, 18:185-193, 1999.

NAYYAR, H. Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. **Environmental and Experimental Botany**, v.50, p.253-264, 2003.

NUCCIO, M. L.; RHODES, D.; McNEIL, S.D.; HANSON, A D. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. **Current Opinion. Plant. Biology**. 2: 128-134, 1999.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C. AND JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **Plant Cell** 2: 279-289, 1990.

OZDEN, M.; DEMIREL, U.; KAHRAMAN, A.; Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. **Scientia Horticulture**. 2008. Doi: 10.1016/j.scient.2008.07.31

PALAUQUI, J. C.; ELMAYAN, T. POLLIEN, J. M.; VAUCHERET, H. Systemic acquired silencing: transgenic specific posttranscriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. **EMBO Journal**. 16:4738-4745, 1997.

PAOLI, L.G. ;(1), CAMARGO, R. L. B.; HARAKAVA, R.; MENDES B. M. J.; Mourão, F. A. A. Transformação genética de laranja 'Valência com o gene cecropin MB39. **Pesquisa. Agropecuária. Brasileira., Brasília**, v.42, n.11, p.1663-1666, nov. 2007.

PARVANOVA, D.; IVANOV, S.; KONSTANTINOVA, T.; KARANOV, E.; ATANASSOV, A; TSVETKOV, T.; ALEXEVA, Y.; DJILIANOV, D. .Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress. **Plant Physiol. Biochem.** 42:57-63, 2007.

PARIDA, A.K. Differential responses of the enzymes involved in proline biosynthesis and degradation in drought tolerant and sensitive cotton genotypes during drought stress and recovery **Acta Physiol Plant** 30:619–627 , 2008. DOI 10.1007/s11738-008-0157-3.

PAWŁOWSKI W.P. and SOMERS D.A. Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proc. National. Academy. Science.* USA 95: 12106–12110, 1998.

PENG, Z.; LU, Q.; VERMA, D.P.S. Reciprocal regulation of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline desidrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. **Molecular. Genetic.** 253: 334-341, 1996.

PILEGGI, M.; PEREIRA, A A. M.; SILVA, J.S.; PILEGGI, S.A V.; VERMA, D.P.S. An improved method for transformation of lettuce by *Agrobacterium tumefaciens* with a gene that confers freezing tolerance. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 44:191-196, 2001.

RAYAPATI, P.J.; STEWART,C.R.; HACK, E. Pyrroline-5-carboxylate reductase in pea (*Pisum sativum*) leaf chloroplasts. **Plant Physiology.** 91:581-586, 1989.

RAHMAN, M., IMRAN A., HUSNAIN, T., RIAZUDDIN, S. RNA interference: The story of gene silencing in plants and humans. Published by **Elsevier** Inc. 10.1016/12.002, 2008.

REDDY, A.R. ; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, N. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Fisiology*, 16:1189-1202, 2004.

REGISTER III, J.C.; BEACHY, R.N. Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. **Virology**, v. 166,p. 524-532, 1988.

REGISTER, J.C., PETERSON, D.J., BELL, P.J., BULLOCK, W.P., EVANS, I.J., FRAME, B., GREENLAND, A.J., HIGGS, N.S., JEPSON, I., JIAO, S.P., LEWNAU, C.J., SILLICK, J.M. and WILSON, H.M. Structure and function of selectable and non-selectable transgenes in maize after introduction by particle bombardment. **Plant Molecular Biology**. 25: 951–961, 1994.

RENTSCH, D.; HIRNER, B.; E. SCHMELZER and W. B. FROMMER. Salt Stress-Induced Proline Transporters and Salt Stress-Repressed Broad Specificity Amino Acid Permeases Identified by Suppression of a Yeast Amino Acid Permease-Targeting Mutant. **The Plant Cell**, Vol 8, Issue 8 1437-1446, Copyright © 1996 by American Society of Plant Biologists.

RODRIGUES, O.; LHAMBY, J. C. B.; DIDONET, A.E.; MARCHESE, J. A.; SCIPINI, C. .Efeito da deficiência hídrica na produção de trigo. **Pesquisa. Agropecuária. Brasileira**, 33: 839-846, 1998.

ROY, D.; BASU, N.; BHUNIA, A. And BANERJEE, S.K..Counteraction of exogenous L-proline with NaCl in salt-sensitive cultivar of rice. **Biologia Plantarum**, 35:69-72, 1993.

ROOSENS, N.H.C.J.; THU T.T.; ISKANDAR, H.M.; JACOBS, M. Isolation of ornithine- δ -aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol**. 117: 263-271, 1998.

ROOKE, L.; STEELE, S. H.; BARCELO, P.; SHEWRY, P. R.; LAZZERI, P. A. .Transgene inheritance, segregation and expression in bread wheat. **Euphytica** 129 301-309, 2002.

RUIZ, M.T.; VOINNET, O.; BAULCOMBE, D.C.Initiation and Maintenance of Virus-Induced Gene Silencing. **The Plant Cell**, v.10, p.937-946, 1998.

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.2, n. 3, p. 287-294, 1998.

SAHRAWAT, A.K.; BECKER, D.; LUTTICKE, S.; LORZ, H. Genetic improvement of wheat via alien gene transfer, an assessment. **Plant Science**. 165:1147-1168, 2003.

SAÍRAM, R.K.;DESMUKH, P.S.; SAXENA,D.C. Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerant to water stress. **Biologia Plantarum**, 41: 387-394, 1998.

SAÍRAM, R.K.; RAO, K.V.; SRIVASTAVA, G. Differential response of wheat genotypes to long term salinity in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. **Plant Science**. 162: 1037-1046, 2002.

SAKAMOTO, A & MURATA, N. Genetic engineering of glycine-betaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**. 51:81-88, 2000.

SAWAHEL, W.A. & HASSAN, A.H. Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. **Biotechnol. Lett.** 24:721-725, 2002.

SEKI, M.; KAMEI, A; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINAZAKI, K. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. **Current. Opinion. Biotechnol.** 14: 194-199, 2003.

SERRAJ, R. & SINCLAIR, T.R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant Cell and Environment** 25: 333-341, 2002.

SCHONFELD, M. A.; Water Relations in Winter Wheat as Drought Resistance Indicators. Published in **Crop Sci** 28:526-531 (1988).

SHARP, R.E.; BOYER, J.S.; NGUYEN, H.T.; HSIAO, T.C. Genetically engineered plants resistant to soil drying and salt stress: how to interpret osmotic relations. **Plant Physiol.** 110:1051-1053, 1996.

SHEN, Q. & HO, T-H. H. Functional dissection of an abscisic acid (ABA) – inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. **Plant Cell**. 7: 295-307, 1995.

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

SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**. 115:327-334, 1997.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought stress. In: *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*. Edited by Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki, K. Austin, TX: RG Landes: 1999:11-28, 1999.

SILVA-ORTEGA, C.O; OCHOA-ALFARO, A.E; REYES-AGUERO, J.A; AGUADO-SANTACRUZ, G.A; JIMÉNEZ-BREMONT, J.F. Salt stress increases the expression of P5CS gene and induces proline accumulation in cactus pear. Académie des sciences. Published by **Elsevier Masson SAS**. 2007. doi:10.1016/j.plaphy.2007.10.01

SIMONOVA-STODOVA, L.; DEMIRECSKA, K.; PETROVA, T; TSENOV, N.; FELLER,U. Antioxidante protection and proteolyte activity in tolerant and sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties subjected to long term field drought. **Plant Growth regulators**58:107-117, 2009.

SLAMA, I. ; GHNAYA, T.; SAVOURÉ, A.; ABDELLY, C. 2008. Combined effects of long-term salinity and soil drying on growth, water relations, nutrient status and proline accumulation of *Sesuvium portulacastrum* Académie des sciences. Published by **Elsevier Masson SAS**, 2009. doi:10.1016/j.crvi.2008.03.006.

SMITH,C.J.; DEUTCH, A.H.;RUSHLOW, K.E.Purification and characteristics of a gamma-glutamyl kinase involved in E.Coli proline biosynthesis. **Journal of Bacteriology** 157:545-551, 1984.

SMITH, M. E. ; COFFMAN, W.R; BAKER, T.C. . Environmental effects on selection under high and low-input conditions IN M.S. Kang (ed) Genotype-by-environment Interaction and Pant Breeding. **Lousiana State University**, Baton Rouge, LA. pp261-272, 1990.

SOBRINHO, J. S. & SOUZA, M.A. Origem descrição botânica e desenvolvimnto do tigo.**Informe Agropecuario**, 97. 9-13, 1983.

SMIRNOFF, N. & CUMBES, Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochem.** 28:1057-1060, 1989.

SONGSTAD, D.D.; DUNCAN, D.R. and WIDHOLM, J.M. Proline and polyamine involvement in chilling tolerance of maize suspension culture. **Journal of Experimental Botany**, 41:289-294, 1990.

SU, J. & WU, R. Stress inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than with constitutive synthesis. **Plant Science**. 166: 941-948, 2004.

SU, J.; SHEN, Q.; HO, T-H. D.; WU, R. Dehydration-stress-regulated transgene expression in stably transformed rice plants. **Plant Physiology**. 117:913-922, 1998.

STEIN, N.; HERREN,G.; KELLER,B. A new DNA extraction method for high throughput marker analysis in a large genome species such as *Triticum aestivum*. **Plant Breeding**, 120:354-356, 2001.

STOGER, E.; WILLIAMS S; KEEN, D.; CHRISTOU, P. Molecular characteristics of transgenic wheat and the effect on transgene expression.. **Transgenic Research** 7, 463-471, 1998.

SZOKE, A.; MIAO, G. H.; HONG, Z.; VERMA, D.P.S. Subcellular location of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase in root/nodule and leaf of soybean. **Plant Physiol.** 99: 1642-1649, 1992.

STAM, M; MOL, J.N.M; KOOTER, J. M. The silence of genes in transgenic plants. **Annals of Botany.** 79: 3-12, 1997.

TAIZ, L. & ZGEIGER, E.2004..**Plant Physiology.** 3º ed. Ed Artmed. Trad Eliane Santarém . Porto Alegre, RS.

TABAEI-AGHDAEI, S.R.; PEARCE, R.S.; HARRISON, P. Sugars regulate cold-induced gene expression and freezing tolerance in barley cell cultures. **Journal of experimental Botany**, 54: 1565-175, 2003.

TEXEIRA, L.R. . **Regeneração, caracterização de plantas transgênicas de soja.** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009. 133p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).

TIMASHEFF, S. N. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? Annu. **Rev. Biophys. Biomol. Struct.** 22:67-97, 1993.

THOMASHOW, M.F. Role of cold responsive genes in plant freezing tolerance. **Plant Physiology**, 1181-7, 1998.

ULKER, B.; ALLEN, G.C.;THOMPSON,W.F.; SPIKER, S.;WEISSINGER, A.K. A tobacco matrix attachment region reduces the loss of transgene expression in the progeny tobacco plants.**The Plant Journal** 18:253-263, 1999.

VANRENSBURG, L.; KRUGER, G.H.J.; KRUGER, R.H. Proline accumulation as drought tolerance selection: Its relationship to membrane integrity and chloroplast ultra structure in *Nicotiana tabacum* L. J. **Plant Physiol.**141:188-194, 1993.

VAUCHERET,H.;PALAUQUI,J.C.; ELMAYAN,T.; MO VATT B . Molecular and genetic analysis of nitrite reductase co-suppression in transgenic tobacco plants. **Mol Gen Genet** 248:311–317, 1995.

VAUCHERET,H.; MOURRAIN,P.; ROBALO,J-C.; POLLIEN,J-M

Nitrite reductase silencing as a tool for selecting spontaneous haploid plants. **Plant Cell Rep** 15:12–16, 1995.

VAN DER KROL, R.; MUR, L. ; BELD, M.; MOL, J.; STUITJE, R. Flavonoid genes in Petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. **Plant cell** 2: 291-299, 1990.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. **Journal of Cell Science**. 114:3083-309, 2001.

VAUCHERET H, BECLIN C, ELMAYAN T, FEUERBACH F, GODON C, MOREL JB .Transgene-induced gene silencing in plants. **Plant Journal**;16:651–9, 1998.

VENDRUSCOLO, E.C.G.; SCHUSTER,I.; PILEGGI, M.; SCAPIM, C.A.; MARUR,C.J.; MOLINARI, H.B.; VIEIRA,L.G. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. **Plant Physiology**.164:1367-1376, 2007.

VENDRUSCOLO, E. C. G. Silenciamento Gênico e Transgênicos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**- Ed 31- julho/dezembro, 2003.

VENEKAMP, J.H. Regulation of cytosolic acidity in plants under condition of drought. **Plant Physiology** 76:112-117, 1989.

VOINNET, O & BAULCOMBE, D.C. Systemic signaling in gene silencing. **Nature**. 389:553,1997.

VOINNET, O.; VAIN, P.; ANGELL, S.; BAULCOMBE, D.C. Systemic spread of sequence specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. **Cell**. 95,177-187, 1998.

WANG, W.; VINOGRAD, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and cold: implications for genetic engineering of stress tolerance. **Plant Molecular Biology**, 218:1-14,2003, 2003.

WASSENEGGER, M; PÉLISSIER, T.A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. **Plant Molecular Biology** 37:349-362, 1998.

WASSENEGGER, M. RNA-directed DNA methylation. **Plant Molecular Biology**. 43:203-220, 2000.

- WAY, H.; CHAPMAN, S.; McINTYRE, L.; CASU, R.; XUE, G. P.; MANNERS, J.; WATSON, J. D.; BAKER, T.; BELL, S. P.; GRANN, A.; LEVINE, M & LOSICK, R. 2005 In **Biologia Molecular do gene**. Ed Artmed, p 728. ISBN: 853630684X.
- WATERHOUSE, P.; WANG, M.; LOUGH, T. Gene silencing as na adaptative defence against viruses. **Nature** 411,834-842, 2001.
- WIANNY, F.; ZERNICKA-GOETZ, M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. **Natural Cell Biology**, v. 2, p. 70-75, 2000.
- SHORTER, R. Identification of differentially expressed genes in wheat undergoing gradual water deficit stress using a subtractive hybridisation approach. **Plant Sci.** 168:661-670, 2005.
- WYN JONES, R.G.; STOREY, R.; LEIGH, R.A.; AHMAD, N.; POLLARD, A. A hypothesis on cytoplasmic osmoregulation IN: Regulation of Cell Membrane Activities in Plants (E. Marre, O. Cifferi eds) **Elsevier**, Amsterdam pp 121-136,1977.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINAZAKI, K . Gene expression and signal transduction in water stress response. **Plant Physiology**. 115: 327-334, 1997.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K; SHINOZAKI, K. 2005. Organization of cis acting regulatory elements in osmotic and cold stress responsive promoters. Trends **Plant Science**. 10:88-94.
- YANCEY, P.H. 1994. Compatible and counteracting solutes. IN: Cellular and Molecular **Physiology of Cell Volume Regulation** (K. Strange ed) CRC Press, Boca Raton, 81-109.
- YOSHIBA, Y.; KIYOSUE, T.; KATAGIRI, T.; UEDA, H.; MIZOGUCHI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; WADA, K.; HARADA, Y.; SHINOZAKI, K. Correlation between the induction of a gene for $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the acumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress **Plant Journal**. 7:751-760, 1995.
- YOSHIDA.T. ; SAKUMA, Y. ; TODAKA, D.; MARUYAMA, K. ; QIN, F. ; MIZOI, J.; KIDOKORO, S.; FUJITA,Y.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of an *Arabidopsis* heat-shock transcription factor HsfA3 in the transcriptional cascade downstreamof the DREB2A stress regulatory system. 2008. **Elsevier** doi: 10.1016/j.bbrc.2008.01.134.

ZADOCKS, J.C.; CHANG, T.T.; KONZAK, C.F. A decimal code for growth stages of cereals. **Weed Research**, 14: 415-421, 1974.

ZERBINI, F.M.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, E.C. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus. **Revisão anual de patologia de plantas**, v.13, p. 191-246, 2005.

ZHANG, C-S.; LU, Q.; VERMA, D.P.S. 1995. Removal of feedback inhibition of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. **Journal. Biology. Chem.** 270: 20491-20496.

ZHANG, J.; NGUYEN, H.T.; BLUM, A. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. **Journal. Of Experimental. Botany.** 50:291-302, 1999.

ZHU, B.; SU, J.; CHANG, M.; VERMA, D.P.S.; FAN, Y.L.; WU, R. Overexpression of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice. **Plant Science.** 139:41-48, 1998.

ZHU, Z., WEI, G., LI, J., QIAN, Q., YU, J. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science.** 167, 527-533, 2004.

ZHU, X. et al. Different solute levels in two spring wheat cultivars induced by progressive field water stress at different developmental stages. **Journal of Arid Environments**, v.62, p.1-14, 2005.