



ISSN:1984-2295

Revista Brasileira de Geografia Física

Homepage: www.ufpe.br/rbgfe



Prospecção de Genes de Resistência à Seca e à Salinidade em Plantas Nativas e Cultivadas

Ana Maria Benko-Iseppon¹, Nina Mota Soares-Cavalcanti², Luis Carlos Berlarmino³, João Pacifico Bezerra Neto⁴, Lidiane Lindinalva Barbosa Amorim³, José Ribamar Costa Ferreira Neto², Valesca Pandolfi⁵, Hayana Millena de Arruda Azevedo³, Roberta Lane de Oliveira Silva⁶, Mauro Guida dos Santos⁷; Marccus Vinicius da Silva Alves⁷; Ederson Akio Kido¹

¹Professor(a) da Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética. ²Mestre em Genética pela Universidade Federal de Pernambuco. ³Mestre em Ciências Biológicas Universidade Federal de Pernambuco. ⁴Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco. ⁵Doutora em Ciências (Energia Nuclear na Agricultura), bolsista de pós-doutorado da Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética. ⁶Mestre em Agronomia Universidade Federal Rural de Pernambuco. ⁷Professor da Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica.

Artigo recebido em 09/11/2011 e aceito em 27/12/2011

RESUMO

A seca, o calor e a salinidade são fatores limitantes da lavoura em uma parcela significativa de nosso planeta, locais de clima extremo onde apenas plantas adaptadas são capazes de sobreviver. Porém, quais são os genes de vegetais determinantes desta capacidade de sobrevivência? Com o advento da genômica e da transcriptômica novos mecanismos vêm sendo revelados, contrariando alguns pressupostos previamente existentes. O presente trabalho comenta as principais famílias gênicas associadas à seca e à salinidade em angiospermas, enfatizando o potencial que a flora nativa apresenta para a prospecção de novos genes capazes de contribuir para a geração de plantas que – mesmo não sendo completamente adaptadas ao clima Semiárido, como aquelas nativas desse ambiente – devem apresentar melhor adaptação a períodos inesperados ou mais longos de seca durante seu cultivo, ou mesmo sob níveis moderados de salinidade. Neste contexto, algumas categorias gênicas merecem atenção, à luz dos avanços atualmente existentes na transcriptômica, compreendendo principalmente osmoprotetores, fatores de transcrição, canais de água, LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), proteínas dependentes de ABA (ácido abscísico), proteínas de choque térmico, proteínas transportadoras, fosfolipases C, proteínas de desintoxicação, chaperonas e proteínas receptoras. Porém, a maioria dos estudos têm se baseado em plantas-modelo ou plantas amplamente cultivadas, havendo necessidade de estudos em plantas nativas de ambientes extremos, como a Caatinga nordestina, o cerrado e os campos rupestres, os quais certamente abrigam um grande número de variantes destes genes e provavelmente também de novos genes importantes para o melhoramento e a biotecnologia vegetal.

Palavras-chave: Estresse abiótico, transcriptoma, biotecnologia, tolerância.

Exploration of Genes for Resistance to Drought and Salinity in Native and Cultivated Plants

ABSTRACT

Drought, heat and salinity are limiting factors of crop production in a significant portion of our planet, extreme regions where only adapted plants are able to survive. But what are the determinant genes of plant survivability? With the advent of genomics and transcriptomics new findings have been revealed, some of them confronting previous assumptions. The present work comments on the major gene families related to drought and salinity in angiosperms, emphasizing the potential of the native flora for the discovery of new genes that may contribute to the generation of plants – maybe not fully adapted to the semi-arid climate as native plants – but presenting a better adaptation to unexpected or longer periods of drought during cultivation, or even moderate levels of salinity. In this context, some gene categories deserve a special attention in the light of the current advances in transcriptomics, comprising osmoprotetors, transcription factors, water channels, LEA (*Late embryogenesis abundant*), protein-dependent ABA (abscisic acid), heat shock proteins, transport proteins, phospholipase C, detoxification proteins, chaperones and receptor proteins. However, most studies have been based on model plants or plants widely grown, with an existing need to study native plants in extreme environments, such as the Brazilian "Caatinga", the "cerrados" and "campos rupestres" which certainly harbor a large number of variants of these genes and probably new genes important for plant breeding and biotechnology.

Key-words: Abiotic stress, transcriptomics, biotechnology, tolerance.

* E-mail para correspondência: ana.iseppon@gmail.com (Benko-Iseppon, A. M.).

1. Introdução

As mudanças climáticas em curso têm gerado preocupações em todos os continentes do planeta, desde áreas polares, temperadas ou de clima tropical úmido, até áreas semiáridas ou castigadas tradicionalmente por fenômenos sazonais de seca e calor. Além disso, tais mudanças têm sido objeto de acaloradas discussões e controvérsias, especialmente no que se refere à sua contraposição aos objetivos desenvolvimentistas de vários grupos públicos e privados, que se mostram céticos sobre esta possível ameaça e a velocidade com que tais mudanças podem se estabelecer.

A despeito das dúvidas existentes e dos argumentos de grupos antagônicos—incluindo extremos onde alguns são contra qualquer forma de modificação dos rumos da natureza, até grupos favoráveis ao desenvolvimento a todo custo—é certo que mudanças climáticas sempre ocorreram em nosso planeta e que as mesmas continuam acontecendo de forma inexorável. No que tange à carência de água, alguns dos cenários mais preocupantes já são parte da realidade de algumas regiões do planeta, especialmente regiões áridas e semiáridas, que sinalizam para cenários ainda mais preocupantes no que tange à extensão das terras afetadas por seca e salinidade e os impactos decorrentes sobre sua biodiversidade e os diversos setores produtivos envolvidos, com ênfase para a agropecuária.

É sabido que a origem a vida em nosso

planeta, incluindo os membros do reino vegetal, ocorreu com extrema dependência da água, sendo a adaptação ao ambiente terrestre decorrente de várias adaptações fisiológicas e anatômicas, sendo que a ocupação vegetacional do ambiente terrestre ocorreu a partir processos de evolução lenta e a partir de diferentes estratégias (Kendrik & Crane, 1997). Ao longo do tempo, as plantas foram submetidas a diferentes tipos de ambientes definidos pelas condições edafoclimáticas, adaptando-se inclusive a ambientes onde a disponibilidade hídrica é limitada, como ocorre em alguns ecossistemas brasileiros, como a Caatinga, a restinga, o cerrado e os campos rupestres (Figura 1). Acredita-se que esse processo tenha ocorrido ao longo dos últimos 400 milhões de anos, a partir da pressão seletiva dos ambientes secos e salinos fora dos mares, gerando variações no comportamento entre espécies e culminando com a geração de plantas adaptadas aos ambientes mais áridos (Dietrich *et al.*, 2001).

Plantas adaptadas a ambientes de seca e calor extremos, como no caso destes ilustrados na Figura 1, apresentam adaptações específicas sem as quais sua ocorrência e sobrevivência seriam ameaçadas. Juntos, os estresses abióticos são responsáveis por desencadear uma série de respostas das plantas, que podem ser percebidas através das modificações morfológicas, fisiológicas, moleculares e metabólicas, a fim de tolerar estes estresses.

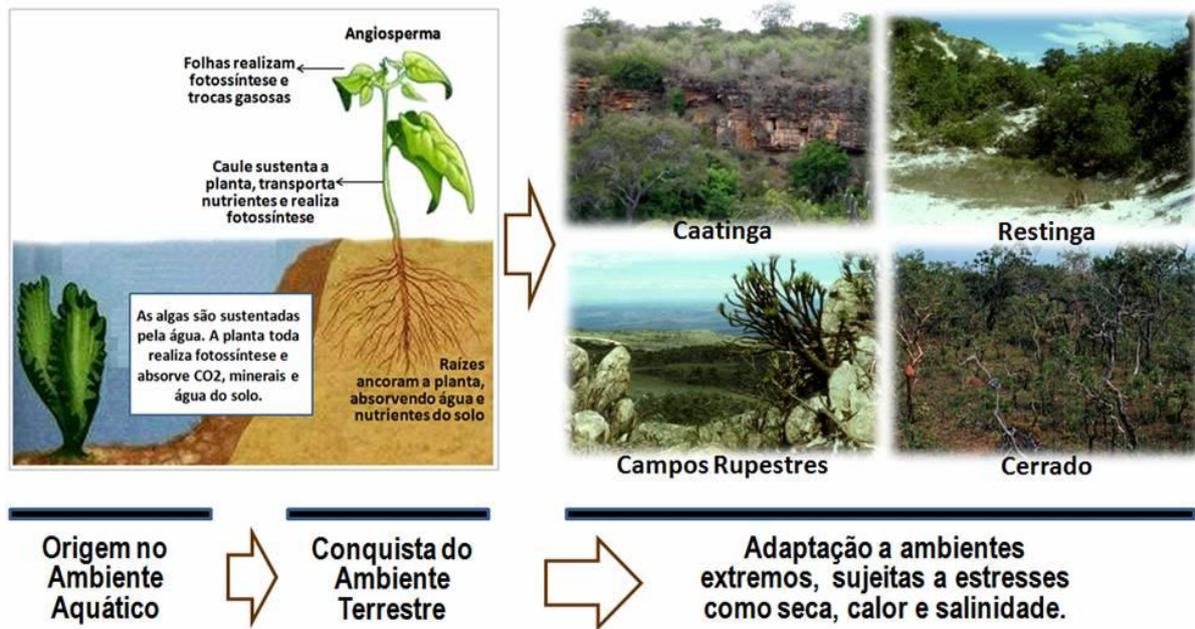


Figura 1. As plantas, como os demais organismos em nosso planeta, se originaram em ambientes aquáticos. Ao longo de sua evolução, as plantas foram sujeitas a pressões ambientais que as tornaram adaptadas a diversos nichos ecológicos, incluindo ambientes como a Caatinga, a restinga, os campos rupestres e o cerrado, onde há pronunciada carência de recursos hídricos.

Seca, alta salinidade, bem como baixas ou altas temperaturas se constituem em fatores severamente limitantes da produção vegetal. Quando tais estresses abióticos ocorrem, várias respostas bioquímicas e fisiológicas são induzidas nas plantas, de forma a propiciar a tolerância ou aumentar as chances de sobrevivência às condições adversas. Plantas mais adaptadas a tais estresses, mesmo que ocorram em diferentes continentes, apresentam frequentemente estratégias semelhantes de sobrevivência, incluindo suculência, dormência, folhas com camadas serosas ou ainda a capacidade de armazenar água e nutrientes em estruturas específicas das raízes (Figura 2), entre outras adaptações, as quais dificilmente podem ser transportadas para as plantas cultivadas através do melhoramento ou mesmo da

biotecnologia.

Considera-se que a agricultura tenha aproximadamente 10.000 anos, sendo que o processo seletivo feito pelo homem, por mais que tenha gerado avanços – como a adaptação do trigo ou do milho às baixas temperaturas da Europa – estas não podem ser comparadas à seleção natural ocorrida nos ambientes marginais, onde as plantas nativas se desenvolveram e sofreram adaptações em prazo muito mais longo. O processo de seleção em regiões marginais, sujeitas à falta de água e de nutrientes, tornou os materiais genéticos nativos dessas áreas mais adaptados aos estresses ambientais (Harlan, 1992). Porém, quais genes poderiam conferir diferenças significativas no desempenho de plantas sem as modificações morfológicas exemplificadas na Figura 2?



Figura 2. Ilustração de algumas das adaptações típicas à seca em plantas de ecossistemas brasileiros, incluindo suculência (*Melocactus* sp., Caatinga), folhas com revestimento seroso (*Encholirium* sp., crescendo sobre rochas; campos rupestres), raízes profundas com sistema de reserva (cerrado, local desconhecido), dormência (espécie não determinada, Petrolândia, PE), *Lavoisiera* sp. com folhas imbricadas (campos rupestres), *Portulaca* sp. (Caatinga), apresentando suculência associada a uma densa pilosidade que minimiza a evapotranspiração. As adaptações ilustradas representando caracteres convergentes observados em plantas de diferentes áreas semiáridas, secas ou salinas existentes nos diversos continentes de nosso planeta.

Muitas pesquisas têm se voltado para o esclarecimento dos mecanismos fisiológicos e genéticos relacionados à resistência ou tolerância à salinidade e à seca, com a identificação de genes importantes na determinação destas características. Tais genes têm crescido cada vez mais em

importância para a biotecnologia, dada a escassez de água que vem se agravando progressivamente em termos globais. As reações moleculares ao estresse hídrico em plantas têm sido amplamente analisadas estudando-se diversos genes de resposta à seca, alta salinidade e frio em nível

transcricional, havendo algumas revisões recentes (como Goldack *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012) indicando a complexa interação entre estes genes.

O presente trabalho pretende apresentar e comentar os principais estudos realizados no sentido de identificar os principais processos e famílias gênicas importantes na resposta eficiente face aos estresses abióticos aqui tratados, inferindo sobre sua evolução e considerando sua importância e potencial para uso na biotecnologia vegetal.

2. Desenvolvimento

2.1 Sistemas Fotossintéticos C3, C4 e CAM

Estima-se que processo de fixação fotossintética de CO₂ pelas plantas forneceu carbono para a vida no planeta Terra nos últimos 2,7 bilhões anos, permitindo o estabelecimento de várias outras formas de vida. Mais de 99% da história deste antigo processo tem sido dominada por fotossíntese C3, assim chamada porque seus primeiros produtos são ácidos carboxílicos formados por três átomos de carbono ligados. Porém, entre 25 e 32 milhões de anos atrás, uma inovação evolutiva surgiu em gramíneas tropicais sob a forma de uma bomba de dióxido de carbono por energia solar baseada em ácidos carboxílicos compreendendo quatro carbonos (fotossíntese C4) que aumenta a eficiência da fotossíntese sob condições de calor (Osborne & Beerling, 2006). Tal processo funciona através de bombeamento de CO₂ a partir do mesófilo em

um anel de células especializadas da bainha centrado em torno das nervuras, onde uma versão extremamente localizada da fotossíntese C3 opera sob altas concentrações de CO₂ (Hatch, 1971). Embora esta especialização anatômica "Kranz" seja prevalente na grande maioria das plantas C4 (também chamadas de "concentradoras de CO₂"), a mesma não é essencial, sendo que certas espécies de climas áridos e Semiáridos evoluíram uma forma alternativa da via em que todos os elementos são acondicionados em uma única célula (Voznesenskaya *et al.*, 2001). O chamado metabolismo do ácido de crassuláceas (CAM, *Crassulacean Acid Metabolism*) é considerado como uma variação do mecanismo unicelular de carbono, sendo mais amplamente adotado em espécies tolerantes à seca, operando pela separação temporária das atividades de uma bomba semelhante à C4 e o mecanismo fotossintético C3 (Osborne & Beerling, 2006).

É interessante notar que o metabolismo C4 evoluiu mais de 50 vezes independentemente em várias famílias monocotiledôneas e dicotiledôneas (Sage, 2004; Christin *et al.*, 2008), acreditando-se que um declínio nas concentrações atmosféricas de CO₂ teria desencadeado este processo de evolução convergente. Porém, esta hipótese tem sido questionada pela falta de provas geológicas para tal declínio (Osborne & Beerling, 2006). Como esperado para uma via metabólica que evoluiu independentemente tantas vezes, isoformas

para os genes que codificam enzimas C4 também estão presentes nas plantas C3 sendo, porém, reguladas e expressas em níveis baixos (Ku *et al.*, 1996). Por sua vez, isôgenos C4 são normalmente expressos em altos níveis, sendo regulados por múltiplos estímulos, incluindo luz, disponibilidade de nutrientes e estímulos metabólicos, expressão esta geralmente confinada ao mesófilo ou à bainha (Hibberd & Covshoff, 2010, Peterhansel, 2011).

As vantagens apresentadas pelos sistemas fotossintéticos C4 e CAM sob condições de estresse abiótico como seca e salinidade são indiscutíveis. Desde a descoberta da fotossíntese C4 em meados dos anos 1960, os biólogos vegetais têm sonhado com a introdução da via fotossintética C4 em plantas C3 como o arroz e a soja (Sage & Zhu, 2011). Porém, até que ponto a eficiência de tais sistemas pode ser extrapolada para inferências biotecnológicas visando ao melhoramento da eficiência fotossintética de plantas cultivadas ou para aplicações no reflorestamento de áreas degradadas?

Ensaio com plantas transgênicas têm se valido principalmente de abordagens visando reduzir a fotorrespiração, focadas no aumento da eficiência de carboxilação de Rubisco, reduzindo a reação oxigenase através da manipulação direta de rubisco, concentrando CO₂ no seu entorno através da introdução de enzimas da via C4. Outra abordagem tem visado uma redução da fotorrespiração

diretamente pela manipulação de enzimas nessa via (Raines, 2006). Porém, até o momento nenhuma das abordagens resultou em plantas transgênicas com maior fotossíntese ou crescimento. Em vez disso, muitas vezes efeitos deletérios foram observados. Aparentemente um ciclo C4 verdadeiro requer a atividade coordenada de várias enzimas em diferentes tipos de células e em resposta a diversos estímulos metabólicos. Tal suposição foi confirmada por uma recente comparação do transcriptoma de duas espécies de *Cleome* (família Cleomaceae, ordem Brassicales) proximamente relacionadas, *C. spinosa* (C3) e *C. gynandra* (C4), revelando mais de 600 transcritos diferencialmente modulados (Bräutigam *et al.*, 2011).

Apesar das dificuldades, em uma recente revisão sobre o tema Peterhansel (2011) enfatiza que a biotecnologia apresenta potencial de aumentar a eficiência fotossintética através do uso de sequências regulatórias e de transferência de múltiplos genes. Esforços significativos estão sendo feitos no sentido de incorporar o metabolismo e a anatomia C4 em arroz, levando ao estabelecimento do “Consórcio Internacional do Arroz C4”, compreendendo provavelmente a mais ambiciosa iniciativa em engenharia metabólica de plantas até o presente. Os principais objetivos da rede envolvem a indução da expressão de enzimas C4 clássicas do ciclo NADP-ME, direcionando ou restringindo a expressão do gene rubisco e da

glicina descarboxilase de forma semelhante ao que acontece em plantas C4, além de identificar genes associados a alterações anatômicas e fisiológicas importantes em plantas C4. As principais abordagens envolvem análises transcriptômicas e metabólicas em larga escala, com ênfase para a geração de mutantes de ativação em arroz e de perda de função em sorgo (Kajala *et al.*, 2011; Peterhansel, 2011).

2.2 Orquestração da Resposta a Estresses Abióticos

Por muitos anos se discutiu com base em evidências fisiológicas quais os possíveis fatores induzidos após o aparecimento de seca, salinidade, mudanças de temperatura, etc., havendo controvérsias quanto ao número de genes associados a estes estresses e à velocidade que estes podiam ser induzidos após a percepção do estresse. Em nível de genoma e transcriptoma, as primeiras evidências surgiram a partir dos estudos com a planta modelo *Arabidopsis thaliana*, pertencente à família das Brassicaceae (à qual pertence a couve, a mostarda, o rabanete e a canola, entre outras). Esta planta foi proposta como modelo devido a seu genoma pequeno (125 megabases), tamanho diminuto (em uma área equivalente a uma folha de papel A4 é possível crescer até 50 indivíduos), curto tempo de geração (~2,5 semanas), produzindo um número significativo de descendentes a cada geração (Meinke *et al.*, 1998). Esta planta encontra-se distribuída em vários

países da Europa, ocorrendo inclusive em áreas secas e extremamente frias, como a Sibéria. Trata-se da planta mais detalhadamente estudada até o momento, sendo que além do sequenciamento completo de seu genoma, existe um extenso número de estudos de expressão diferencial e programas envolvendo a geração de mutantes para o entendimento dos processos envolvendo seus estimados 25.498 genes de 11.000 famílias (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Estudos visando monitorar a expressão de 7.000 genes de indivíduos de *A. thaliana* submetidos em experimentos separados à seca, a altos níveis de salinidade e ao frio revelaram expressão aumentada (em mais de cinco vezes comparativamente aos controles não-estressados) de 277, 194 e 53 genes, respectivamente, havendo um grande número de genes compartilhados entre diferentes tipos de estresse (Figura 3).

Além disso, a indução da ativação destes genes após os estímulos citados ocorria muito rapidamente, com a maioria dos genes recrutados apenas no intervalo de duas horas após o estresse (Seki *et al.*, 2002). É interessante notar que 22 genes tinham sua expressão aumentada em todas as três situações de estresse abiótico, enquanto seca e salinidade compartilharam 119 genes induzidos (Figura 3). Na definição da resistência e/ou da susceptibilidade aos estresses citados, torna-se importante não apenas observar *quais* genes são ativados, mas *a velocidade* com que determinados

fatores são transcritos, observando-se acentuadas diferenças entre indivíduos resistentes e suscetíveis, sob este aspecto. Entre os três grupos de estresses, 11 genes imediatamente induzíveis na fase pós-estresse

(entre poucos minutos até 2 horas após o tratamento) foram observados, revelando-se como possíveis fontes gênicas de resistência a estresses abióticos (Seki *et al.*, 2002).

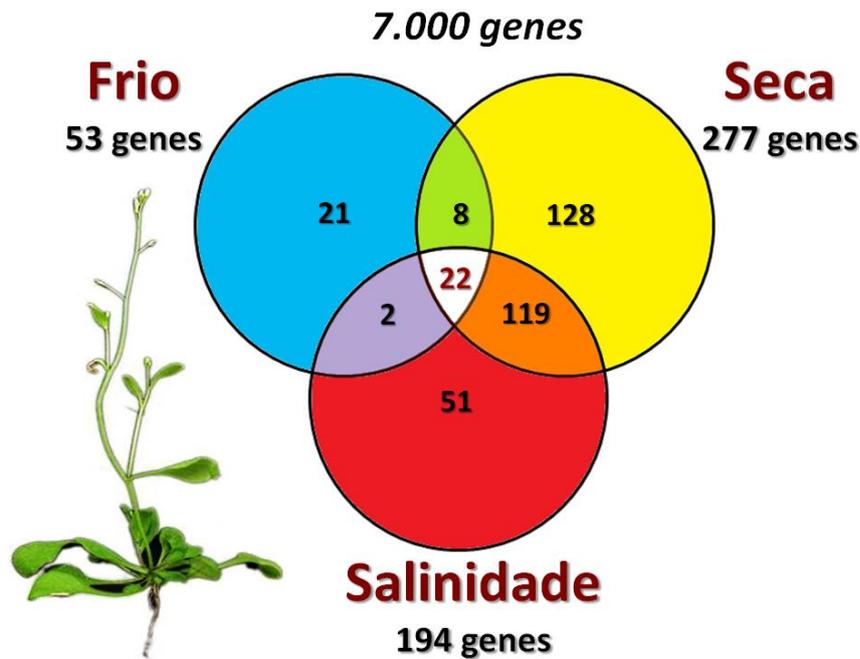


Figura 3. Análises realizadas com a planta-modelo *Arabidopsis thaliana* revelaram que entre sete mil genes analisados, 524 eram recrutados e tinham sua expressão aumentada em mais de cinco vezes, num curto espaço de tempo. Adaptado de Seki *et al.* (2002).

Estudos como o de Seki *et al.* (2002) revelaram que os mecanismos genéticos de percepção que estão sendo relacionados em plantas às respostas aos estresses hídrico e salino incluem diversos genes, os quais têm sido tradicionalmente divididos em duas categorias: (I) os envolvidos na cascata de sinalização e no controle transcricional, como MyC, quinases MAP e quinase SOS2, fosfolipases e fatores transcricionais, como HSF, CBF/DREB, bHLH, bZIP, ERF (Figura 4A); (II) aqueles que funcionam diretamente na proteção de membranas e proteínas, como

proteínas de choque térmico e chaperonas; proteínas LEA, osmoprotetores e removedores de radicais livres; e aqueles envolvidos na captura e transporte de água e íons, como as aquaporinas e os trocadores e transportadores de íons (Figura 4B). Tais categorias têm sido enfatizadas em análises com vários organismos (Blumwald, 2000; Seki *et al.*, 2000; Benko-Iseppon *et al.*, 2005; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Goldack *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012), confirmando a complexidade da adaptação a estresses abióticos como os aqui tratados.

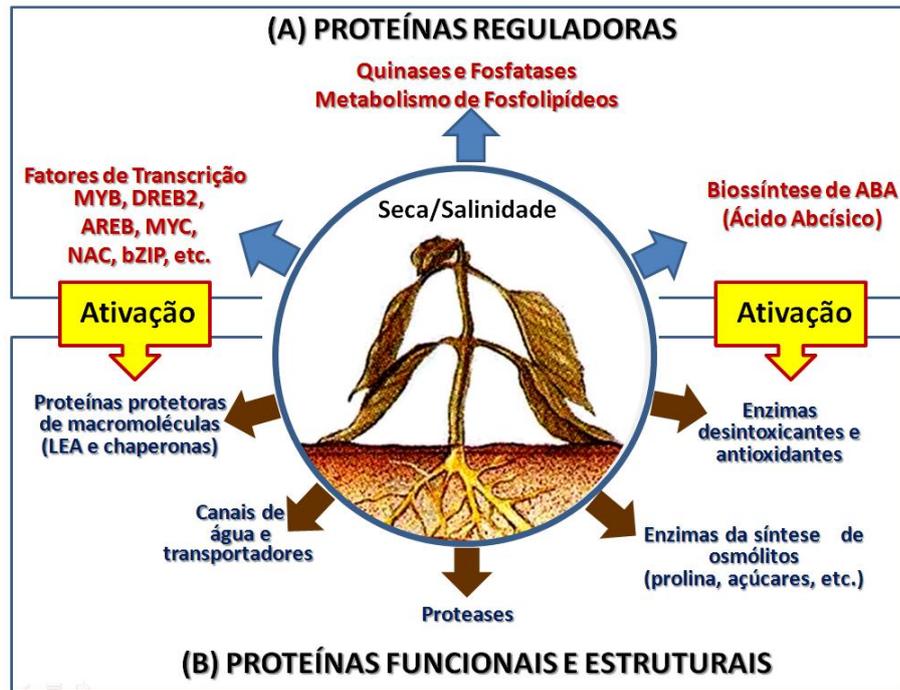


Figura 4. Principais categorias de genes envolvidos na resposta de angiospermas a estresses abióticos como seca e salinidade. O grupo A inclui fatores envolvidos na regulação e transdução de sinais (proteínas reguladoras) reconhecidamente ativadas após o estresse. Tais proteínas induzem cascatas de sinais envolvendo algumas proteínas do grupo B, consideradas funcionais e estruturais, envolvidas nos mecanismos de tolerância aos estresses citados.

Considera-se que as reações dos vegetais ao estresse hídrico e salino são complexas especialmente porque envolvem muitos genes com efeitos aditivos, tornando complexa a real transferência de tolerância a estes estresses para plantas de importância econômica. Devido à complexidade destas respostas moleculares, vários projetos têm investido esforços usando técnicas biotecnológicas via transgênese, super-expressando diferentes genes entre estes das categorias listadas na Figura 4. Dentre estes, destacam-se genes codificantes de osmólitos compatíveis, reguladores do crescimento vegetal, antioxidantes, proteínas de choque térmico, proteínas LEA e fatores de

transcrição (Ashraf, 2010).

Fatores de Transcrição

A regulação da expressão gênica é um processo essencial, sendo relativamente conservado desde bactérias, até humanos e vegetais, passando por mecanismos complexos no decurso da evolução e atuando sobre a expressão gênica em nível de transcrição de RNA mensageiro a partir do DNA, a qual é regulada através de diversos processos, dentre os quais se destaca a regulação por fatores de transcrição (TF) (Grotewold *et al.*, 2010).

Praticamente todos os processos biológicos são diretamente regulados ou

influenciados por TFs. Estes fatores regulam a expressão de genes codificantes de proteínas contendo um domínio de ligação ao DNA (DBD, *DNA Binding Domain*), que reconhece uma sequência de DNA específica. Tais proteínas são classificadas com base na estrutura de seus DBD, embora existam alguns TFs sem DBD, os quais interagem com uma proteína DBD para formar um complexo transcricional (Grotewold *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). Um número significativo de TFs tem sido identificado em angiospermas, capazes de mediar o controle de expressão de dezenas ou centenas de genes-alvo em cascatas de transdução de sinais (Wellner *et al.*, 2005; Vandepoele *et al.*, 2009). O genoma de *Arabidopsis*, por exemplo, apresenta pelo menos 1.554 TFs, correspondentes a cerca de 6% dos genes que a planta codifica – uma quantidade superior a, por exemplo, os 4,7% existentes na mosca de frutas *Drosophila melanogaster* (Riechmann *et al.*, 2000; Vandepoele *et al.*, 2009) – indicando que a regulação da transcrição desempenha um papel mais importante nas plantas do que em animais (Mitsuda *et al.*, 2009).

No que tange à resposta à seca, alguns fatores merecem especial menção. DREB (*Dehydration Responsive Element Binding*) e ERF (*Ethylene-Responsive Factor*) compreendem duas importantes famílias que integram a superfamília AP2/EREBP (*Ethylene-Responsive-Element-Binding Protein*) de fatores de transcrição exclusiva de

plantas. Membros deste grupo têm sido reconhecidos por mais de uma década por seu papel na tolerância ao estresse hídrico através de vias metabólicas ABA-dependentes e independentes e de sua regulação estresse-responsiva que envolve mais de cem genes-alvo. No entanto, estudos com plantas transgênicas indicam que sua expressão precisa de uma sintonia fina, uma vez que a superexpressão constitutiva da via DREB/CBF levou a graves defeitos de desenvolvimento dos transformantes, embora acompanhada por uma maior tolerância ao sal, à seca, e ao frio (Kasuga *et al.* 1999; Singh *et al.*, 2002; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2003).

MYB compreende outra família de TFs que merece menção, estando presente em todos os eucariotos. Em animais e fungos observa-se um número restrito de genes que codificam para estes fatores, os quais apresentam domínios conservados com três repetições (R1, R2 e R3), enquanto em plantas há uma grande variabilidade de fatores, na maioria com duas repetições R2R3 imperfeitas. Por exemplo, em *Arabidopsis* foram reconhecidos 85 genes MYB da classe R2R3, enquanto 42 foram reconhecidos em cana-de-açúcar e 71 em eucalipto (Romero *et al.*, 1998; Soares-Cavalcanti *et al.*, 2009). Proteínas deste grupo são transcionalmente induzidas em resposta a ABA, à salinidade, à seca, e ao frio, influenciando também a expansão celular e a deposição de cutícula, o que relaciona a resposta ao estresse abiótico

também com modificações na estrutura da parede celular, entre outras (Cominelli *et al.* 2008; Lippold *et al.* 2009; Goldack *et al.*, 2011).

Quinases e Fosfatases

Quinases e fosfatases estão entre as mais importantes enzimas envolvidas na reação de transferência de fosfato a partir de moléculas de alta energia do doador (por exemplo, ATP) para substratos específicos (proteínas e lipídios), controlando diferentes vias bioquímicas (Manning *et al.*, 2002) e compreendendo um dos principais mecanismos bioquímicos na sinalização celular. Estima-se que 30% das proteínas em um organismo vivo sejam frequentemente fosforiladas em resíduos de serina e treonina (Cohen, 2000). Por exemplo, observou-se que *Arabidopsis* codifica cerca de 1.000 genes pertencentes à superfamília das quinases, bem como cerca de 300 genes que codificam fosfatases (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). A atividade das quinases é regulada por dois possíveis mecanismos: (1) fosforilação, às vezes pela própria quinase (cis-fosforilação/autofosforilação), por proteínas (2) ativadoras ou inibidoras, e (3) proteínas de ligação no caso moléculas pequenas. Membros da família quinase estão envolvidos nas vias de sinalização de muitas plantas na resposta a estresses abióticos e bióticos (Chen *et al.*, 2004). Por exemplo, em arroz, a expressão de muitos CDPKs (*calcium-dependent protein kinases*) é

induzida por estímulos abióticos. Por exemplo, a expressão do gene *OsCPK7* em arroz transgênico leva a um aumento da sobrevivência após estresse por frio, enquanto a expressão de *OsCPK13* confere maior tolerância à salinidade e à seca (Saijo *et al.* 2000; Abbasi *et al.*, 2004). Em feijão-caupi, a análise da modulação da expressão destas proteínas após estresses abiótico (salinidade) e biótico (virose) indicaram a indução de 100 diferentes candidatos a quinases, contra 69 reprimidos nas diferentes situações analisadas (Kido *et al.*, 2011)

Biossíntese de ABA

Em plantas o hormônio ácido abscísico (ABA) é um produto da clivagem de carotenóides e desempenha um importante papel na resposta a estresses como seca e salinidade, atuando na percepção de sinal de desidratação e como mediador da cascata de sinais ativadora de outros genes responsivos a estes estresses, com ênfase para fatores de transcrição. Sob estresse hídrico a planta induz acúmulo de ABA, presumivelmente a partir da clivagem do 9-cis-epoxycarotenoide (9-cis-violaxanthina e 9-cis-neoxanthina) para xantoxina pela enzima 9-cis-epoxycarotenoide dioxigenase. Considera-se que o ABA desencadeie vários mecanismos de defesa a estresses abióticos, bem como a alguns estresses bióticos (um tipo de “resposta cruzada” denominada “*crosstalk*” em inglês), considerando-se seu importante papel na ativação de fatores de transcrição,

incluindo-se os fatores DREB já citados, bem como fatores bzip, MYB e MYC. Além disso, este hormônio tem sido associado à maturação e ao desenvolvimento de sementes e ao processo de fechamento dos estômatos pós percepção de estresse hídrico (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006). A mencionada resposta cruzada tem atraído a atenção de vários pesquisadores, uma vez que genes responsáveis por resistência a patógenos em plantas também são capazes de ativar vias associadas à tolerância a estresses abióticos, como tem sido observado em vários trabalhos recentes na área de transcriptômica (Kido *et al.*, 2011).

2.2.1 Proteínas Funcionais e Estruturais

Esta categoria envolve diferentes tipos de proteínas, indicadas na Figura 4B, ativadas após a percepção de sinais pelos fatores indicados na Figura 4A, sendo brevemente comentadas a seguir.

Proteínas protetoras de macromoléculas (LEA e chaperonas)

Chaperonas são proteínas capazes de dobrar ou modelar outras proteínas, auxiliando no dobramento de cadeias polipeptídicas nascentes, no redobramento de proteínas desnaturadas, além de prevenir a agregação de partes a proteínas com superfícies hidrofóbicas expostas. Chaperonas moleculares estão também relacionadas a mecanismos de resposta a estresses, sendo algumas identificadas como HSPs (*Heat-*

Shock Proteins), dentre as quais se destacam as HSP70, as chaperoninas, as HSP90, as HSP100 e as sHSP (small HSP). As diferentes classes de chaperonas e de HSPs representam um papel na proteção de proteínas contra o estresse (Wang *et al.*, 2004a).

Por sua vez, proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) como o próprio nome sugere, são acumuladas em sementes durante a fase de maturação, momento em que uma tolerância à dessecação é demandada. Após sua descrição, estudos adicionais revelaram que as proteínas LEA também se acumulam em tecidos vegetativos durante períodos de seca, indicando um papel também na proteção contra a dessecação. São proteínas hidrofílicas, apresentando um alto conteúdo de glicina, sugerindo-se que tenham uma função na manutenção estrutural de outras proteínas, vesículas, endomembranas e no sequestro de íons, como o cálcio, na retenção de água, além de função como chaperonas moleculares (Wang *et al.*, 2004a; Porcel *et al.*, 2005).

Canais de água e transportadores

Para sua sobrevivência, as plantas dependem da aquisição, transporte e transpiração de água. O mecanismo de passagem da água pelas membranas celulares tem sido foco de diversos estudos. Entre os transportadores de membrana, destacam-se os chamados canais de água ou aquaporinas, membros de uma família de pequenas proteínas transmembranas (24-30 kDa), que

compreendem como subgrupos principais as proteínas de membrana plasmática (PIP), proteínas de membrana de tonoplasto (TIP), proteínas de membrana de nódulos (NIP) e pequenas proteínas básicas intrínsecas de membranas (SIP) (Maeshima & Ishikawa, 2008).

Tais proteínas apresentam seis segmentos transmembrana e geralmente formam tetrâmeros protéicos, onde cada monômero forma um poro simples seletivo para o transporte de água e de outros pequenos solutos, permitindo o controle diferencial da osmorregulação entre estágios de desenvolvimento, tecidos e órgãos (Ludewig & Dynowski, 2009). Tais proteínas são importantes para a manutenção da osmolaridade em vegetais, com expressão regulada pela salinidade nos primeiros instantes após o estresse, indicando possibilidades promissoras para sua aplicação na biotecnologia vegetal.

Enzimas desintoxicantes e antioxidantes

O acúmulo de solutos compatíveis também pode proteger as plantas contra danos, através da eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS, *Reactive Oxygen Species*), permitindo a manutenção da estrutura e do funcionamento de proteínas. Na maioria dos organismos aeróbicos, há uma necessidade de efetivamente eliminar as ROS geradas como resultado de pressões ambientais. Dependendo de sua natureza, ROS podem ser altamente tóxicas e

demandam rápida desintoxicação. A fim de controlar os níveis de ROS e proteger as células dos danos oxidativos, plantas desenvolveram um complexo sistema antioxidante, que inclui várias enzimas e metabólitos não-enzimáticos (Vranova *et al.*, 2002). Entre as enzimas envolvidas na proteção oxidativa destacam-se as glutatona peroxidases, as superóxido dismutases, as peroxidases de ascorbato e as glutatona redutases.

Por exemplo, plantas transgênicas de *arabidopsis* expressando o dobro de uma superóxido dismutase (*Mn-SOD*) apresentaram notável crescimento, mesmo após tratamento com 150 mM de NaCl, enquanto as plantas não transformadas secaram gradualmente (Wang *et al.*, 2004b).

Proteases

Proteases desempenham papéis multifacetados, praticamente em todos os aspectos da fisiologia e desenvolvimento vegetal, incluindo crescimento, desenvolvimento, senescência e morte celular programada, bem como na acumulação e mobilização das proteínas de armazenamento (por exemplo, em sementes). Além disso, estão envolvidas em vias de sinalização e na resposta a estresses bióticos e abióticos (Grudkowska & Zagdańska, 2004).

Especialmente as proteinases de cisteínas são importantes, uma vez que a degradação de proteínas danificadas ou desnaturadas sob estresse está intimamente

associada à síntese de novas proteínas, sendo os aminoácidos reutilizados para tal síntese ou para ajustar as células osmoticamente à limitação de água (Vincent & Brevin, 2000). Por exemplo, observou-se que em resposta ao déficit hídrico, proteinases de cisteína foram induzidas em plantas aclimatadas e não aclimatadas de trigo (Zagdańska & Wisniewski, 1996).

Osmoprotetores

Osmoprotetores são pequenos solutos utilizados pelas células de diversos organismos e tecidos em situações de carência de água para manter o volume da célula (Yancey, 2001), podendo desempenhar outros papéis associados à tolerância a estresses hídricos e osmóticos, atuando como proteínas estabilizantes, com ação antioxidante. Compreendem açúcares, principalmente frutose e sacarose, alcoóis de açúcar (como o mio-inositol), açúcares complexos (como trealose e frutanos) e metabólitos (como glycina-betaina, prolina e ectoína) (Yancey, 2005). O acúmulo de solutos compatíveis em resposta ao estresse osmótico é um processo onipresente em organismos tão diversos como bactérias, plantas e animais (Bohnert & Jensen, 1996). Osmoprotetores se acumulam principalmente no citosol, nos cloroplastos, bem como em outros compartimentos citoplasmáticos (Rontein *et al.*, 2002.), protegendo as plantas de formas diferentes, incluindo: defesa por ajuste osmótico (ajudando as células a manter seu turgor e seu

estado hidratado); estabilização de proteínas e enzimas; indução de proteínas de estresse e aceleração dos sistemas de limpeza de espécies reativas de oxigênio (Bohnert & Jensen 1996; Ashraf & Foolad, 2007). Em plantas que naturalmente acumulam osmoprotetores, seus níveis são aumentados sob estresse, desempenhando importante papel no estabelecimento de mecanismos de tolerância (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Estudos analisando a diversidade e abundância destes compostos entre ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de eucalipto (Santos *et al.*, 2009) e cana-de-açúcar (Santos *et al.*, 2011) avaliando as cinco categorias (prolinas, glycinas-betainas, mio-inositol, trehalose e cisteínas) revelaram respectivamente 56 e 51 membros com distribuição na maioria das bibliotecas genômicas, no caso da cana com ênfase em bibliotecas sob estresse (cultivo de calos e infectadas com *Herbaspirillum rubrisubalbicans*). Uma recente análise de expressão diferencial de osmoprotetores em cana-de-açúcar (Silva *et al.*, 2011) usando a técnica de SuperSAGE e sequenciamento de segunda geração revelou vários candidatos induzidos em bibliotecas submetidas a estresse por seca, com diferenças significativas entre indivíduos tolerantes e sensíveis a este tipo de estresse.

2.3 Biotecnologia e Implicações para a Agricultura em Áreas Secas e Salinas

Os genes comentados anteriormente estão entre os mais estudados em plantas, face à sua participação nos processos envolvidos com a resposta a estresses abióticos, com ênfase para seca e salinidade. Sua utilização no melhoramento ou ainda por via biotecnológica tem sido objeto de intensos estudos. Neste contexto, a engenharia genética apresenta-se como uma ferramenta poderosa na transformação das plantas, que passarão a apresentar maior resistência e/ou tolerância aos diferentes estresses.

Várias pesquisas têm tentado aumentar a tolerância aos estresses abióticos através da transferência de genes específicos. Os genes selecionados para a transformação são geralmente aqueles que codificam proteínas específicas induzidas por estresses abióticos com funções conhecidas, incluindo os canais de água, enzimas para a biossíntese de osmólitos e desintoxificação, além das relacionadas ao transporte iônico. Vários genes individuais parecem ter algum impacto positivo na tolerância ao estresse. Apesar disso, acredita-se, a tolerância à seca e à salinidade devem ser mais eficientes e duradouras em projetos de engenharia metabólica envolvendo vários genes e vias, extrapolando a tolerância induzida por um único gene (Athar e Ashaf, 2009).

Apesar disso, há exemplos de sucesso em inferências com um único gene superexpresso, como no caso de alguns dos genes da via SOS (*Salt Overly-Sensitive*), apresentada de forma esquemática na Figura

5. Estudos prévios indicam que um complexo proteico formado pela proteína ligadora de cálcio SOS3 e pela proteína quinase de serina/treonina SOS2 sejam ativados por um sinal de cálcio elicitado pelo estresse salino. Este complexo seria responsável pela fosforilação e ativação de vários transportadores iônicos, como os trocadores de Na^+/H^+ de membrana (SOS1) e de vacúolo (NHX1). Inferências biotecnológicas têm mostrado que a superexpressão do gene *NHX1* é capaz de produzir plantas mais adaptadas à salinidade (Qiu *et al.*, 2002).

Em decorrência de seu potencial, muitos genes que codificam antiporters Na^+/H^+ vacuolar (*NHX*) foram caracterizados e identificados em diferentes espécies. Por exemplo, Li *et al.* (2010) clonaram um novo gene de antiporte vacuolar na halófito *Salsola soda* usando a técnica de RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) e introduziram tais genes em alfafa (*Medicago sativa*), a qual se apresentou mais tolerante à salinidade e cresceu em condições de altos níveis de NaCl. As linhagens transgênicas de alfafa sobreviveram em solos comprometidos pelo excesso de sais e poderão ser úteis na exploração e no cultivo em áreas degradadas.

Conforme enfatizado por Yang *et al.* (2009), embora o gene *NHX* seja de grande importância no controle osmótico das plantas, para exploração completa de seu potencial é essencial sua expressão em conjunto com os demais genes da via SOS (Figura 5), observando-se que em plantas transgênicas

co-expressando os genes *SOS1*, *SOS2* e *SOS3* houve tolerância expressivamente maior do que em plantas transgênicas superexpressando qualquer um dos genes individualmente. Além disso, os autores evidenciaram que a superexpressão do gene *AtNHX1* em *A. thaliana* não aumentou significativamente a

tolerância à salinidade comparativamente às plantas controle. Considerando que a intervenção da transformação vegetal pode facilitar o desenvolvimento de linhagens tolerantes, as estratégias disponíveis têm tido bastante êxito na incorporação de tolerância em diferentes espécies (El-Sayed *et al.*, 2007).

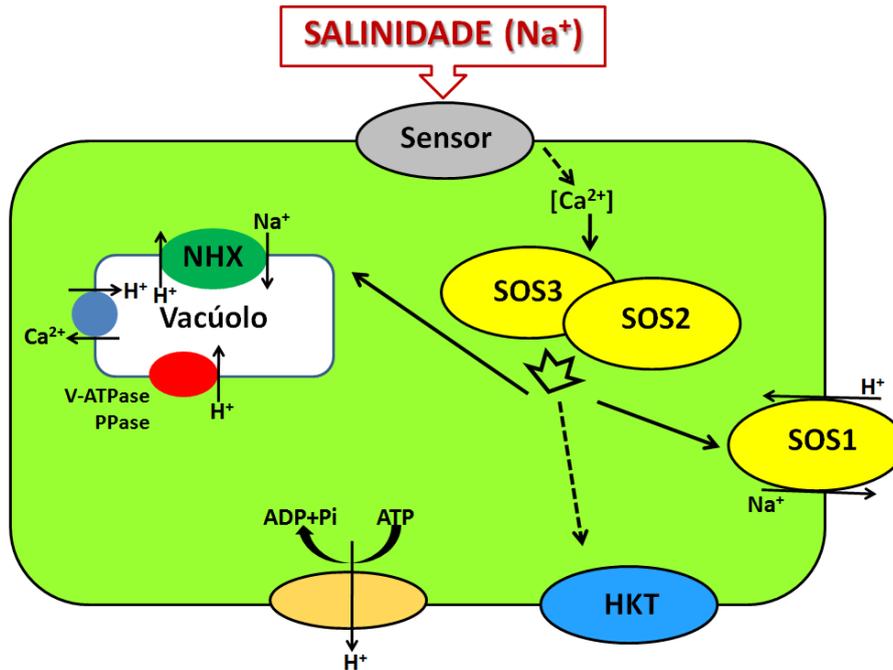


Figura 5. Representação esquemática dos principais fatores envolvidos na regulação da concentração intracelular do Na^+ pela via SOS. O estresse sódico inicia um sinal de cálcio que estimula o complexo SOS3/SOS2, o qual ativa o gene *SOS1*, que passa a excluir o Na^+ , e regula a síntese de fatores envolvidos na resposta ao estresse salino a exemplo de NHX e HKT.

3. Conclusão

Os estudos envolvendo a biotecnologia de genes associados a estresses abióticos são o foco central das ômicas, uma das áreas que mais avançam nas ciências biológicas. O termo “ômicas” se aplica à área das ciências biológicas e da engenharia que se dedicam a analisar as interações de dados biológicos derivados das áreas de genômica, transcriptômica, proteômica, interactômica, metaboloma, epigenoma e fenoma, entre

outras. O foco principal visa identificar e associar os dados das diversas abordagens citadas (tais como genes, proteínas e ligantes) através de ferramentas de bioinformática e biologia de sistemas, encontrando relações de interação entre os mesmos, em geral associando dados depositados em bancos de dados a dados laboratoriais e de campo, proporcionando um melhor entendimento das redes e interações entre diferentes fontes de dados.

No Brasil, embora muito venha sendo feito quanto às ômicas relativas a diferentes plantas cultivadas, com ênfase para projetos de transcriptômica, incluindo a cana-de-açúcar (projeto SUCEST), o eucalipto (projeto FORESTs), o feijão-caupi (NordEST) e a soja (consórcio GENOSOJA), há ainda uma carência de estudos com plantas nativas dos diversos ecossistemas citados no presente trabalho.

Estudos envolvendo ecossistemas extremos de outros países têm revelado novas e importantes fontes de genes em plantas adaptadas a tais ambientes estressantes. Tais iniciativas estão se iniciando no Brasil, incluindo três espécies de plantas nativas da Caatinga, das dunas de restingas e tabuleiros costeiros e do cerrado do Brasil em análise pelo nosso grupo. Esses dados tem sido comparados a bancos de dados públicos e locais envolvendo genes dos projetos de genômica acima e de plantas-modelo, acreditando-se tais análises deverão em breve fornecer novos candidatos para uso biotecnológico. Porém, tais estudos necessitam de projetos em rede e com diversas abordagens complementares e interdisciplinares, as quais precisam de investimentos significativos em nível nacional e internacional.

Sem dúvida há um número extenso de plantas candidatas que apresentam adaptações únicas à seca, envolvendo os ecossistemas nacionais citados, ocorrendo em locais próximos a áreas extensamente agricultadas

no Brasil, algumas incluindo regiões em processo de desertificação. Tais plantas seriam da maior importância para uso na biotecnologia de plantas cultivadas nacionalmente, com potencial uso para o seu melhoramento ou para reflorestamento, tornando-nos mais preparados para o enfrentamento das mudanças climáticas em curso.

4. Agradecimentos:

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), ao BNB (Banco Nordeste do Brasil), à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à FACEPE (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco) pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsas.

5. Referências Bibliográficas

- Abbasi, F.; Onodera, H.; Toki, S.; Tanaka, H.; Komatsu, S. (2004). OsCDPKI3, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath. *Plant Molecular Biology*, v. 55, p. 541-552.
- Ashraf, M. (2010). Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 169-183.
- Ashraf, M.; Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and*

Experimental Botany, v. 59, p. 206-216.

Athar, H. R.; Ashraf, M. (2009). *Strategies for Crop Improvement against Salinity and Drought Stress: An Overview*. In: Ashraf, M.; Ozturk, M.; Athar, H. R. (Eds.). *Salinity and water stress: improving crop efficiency*. Chapter 1, 1st Ed. Dordrecht (Netherlands), Springer-Verlag, pp. 1-16.

Benko-Iseppon, A. M.; Soares-Cavalcanti, N. M.; Wanderley-Nogueira, A. C.; Berlarmino, L. C.; Silva, R. R. M.; Almeida, P. M. L.; Brunelli, K. R.; Houllou-Kido, L. M.; Kido, E. A. (2005). *Genes associados a estresses bióticos e abióticos em feijão-caupi [Vigna unguiculata (L.) Walp.] e outras angiospermas*. In: Nogueira, R.J.M.C.; Araújo, E.L.; Willadino, L.G.; Cavalcante, U.M.T. (Eds.): *Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas*. Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal. 1^a Ed. Recife, Imprensa Universitária UFRPE, pp. 350-359.

Blumwald, E.; Aharon, G. S.; Apse, M. P. (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1465, p. 140-151.

Bohnert, H. J.; Jensen, R. G. (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology*, v. 14, p. 89-97.

Bräutigam, A.; Mullick, T.; Schliesky, S.;

Weber, A.P.M. (2011). Critical assessment of assembly strategies for non-model species mRNA-Seq data and application of next-generation sequencing to the comparison of C₃ and C₄ species. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, p. 3093-3102

Chen, M.; Chory, J.; Fankhauser, C. (2004). Light signal transduction in higher plants. *Annual Review of Genetics*, v. 38, p. 87-117.

Christin, P.-A.; Besnard, G.; Samaritani, E.; Duvall, M.R.; Hodkinson, T.R.; Savolainen, V.; Salamin, N. (2008). Oligocene CO₂ decline promoted C₄ photosynthesis in grasses. *Current Biology*, v. 18, p. 37-43.

Cohen, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends in Biochemistry Science*, v. 25, p. 596-601.

Cominelli, E.; Sala, T.; Calvi, D.; Gusmaroli, G.; Tonelli, C. (2008). Overexpression of the Arabidopsis *AtMYB41* gene alters cell expansion and leaf surface permeability. *Plant Journal*, v. 53, p. 53-64.

Dietrich, P.; Sanders, D.; Hedrich, R. (2001). The role of ion channels in light-dependent stomatal opening. *Journal of Experimental Botany*, v. 52, p. 1959-1967.

El-Sayed, O.E.; Rizkalla, A.A.; Sabri, S.R.S. (2007). *In vitro* mutagenesis for genetic

- improvement of salinity tolerance in wheat. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, v. 4, p. 377-383.
- Goldack, D.; King, I.L.; Yang, O. (2011). Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Reports*, v. 30, p. 1383-1391.
- Grotewold, E.; Auer, H. (2010). The DNA-proteome: recent advances towards establishing the protein-DNA integration space. *International Journal of Computer Bioscience*, v. 1, p. 1-3.
- Grudkowska, M.; Zagdańska, B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, v. 51, p. 609-624.
- Harlan J. R. (1992). *Crops & Man*. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy-Crop Science Society.
- Hatch, M.D. (1971). *Mechanism and function of the C4 pathway of photosynthesis*. In: Hatch, M.D.; Osmond, C.D.; Slayter, R.O. (Eds.) *Photosynthesis and photorespiration*. 1st Ed. San Diego, Academic Press, p.p. 139-152.
- Hibberd, J.M.; Covshoff, S. (2010). The regulation of gene expression required for C4 photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, v. 61, p. 181-207.
- Huang, G.-T. Ma, S.-L.; Bai, L.-P.; Zhang, L.; Ma, H.; Jia, P.; Liu, J.; Zhong, M.; Guo, Z.-F. (2012). Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular Biology Reports*, v. 39 p. 969-987.
- Kajala, K.; Covshoff, S.; Karki, S.; Woodfield, H.; Tolley, B. J.; Dionora, M.J.A.; Mogul, R. T.; Mabilangan, A. E.; Danila, F. R.; Hibberd, J. M.; Quick, W. P. (2011). Strategies for engineering a two-celled C4 photosynthetic pathway into rice. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, p. 3001-3010.
- Kasuga, M.; Liu, Q.; Miura, S.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, v. 17, p. 287-291.
- Kenrick, P. & Crane, P. R. (1997). The origin and early evolution of plants on land. *Nature*, v. 389, p. 33-39.
- Kido, E. A.; Barbosa, P. K.; Ferreira Neto, J. C. R.; Pandolfi, V.; Houllou-Kido, L. M.; Crovella, S.; Benko-Iseppon, A. M. (2011). Identification of plant protein kinases in response to abiotic and biotic stresses using SuperSAGE. *Current Protein and Peptide Science*, v. 12, p. 643-656.

- Ku, M.; Kano-Murakami, Y.; Matsuoka, M. (1996). Evolution and expression of C4 photosynthesis genes. *Plant Physiology*, v. 111, p. 949-957.
- Li, W.; Wang, D.; Jin, T.; Chang, Q.; Yin, D.; Xu, S.; Liu, B.; Liu, L. (2010). The vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene SsNHX1 from the halophyte *Salsola soda* confers salt tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 29, p. 278-290.
- Lippold, F.; Sanchez, D.H.; Musialak, M.; Schlereth, A.; Scheible, W. R.; Hinch, D.K.; Udvardi, M.K. (2009). AtMyb41 regulates transcriptional and metabolic responses to osmotic stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 149, p. 1761-1772.
- Ludewig, U.; Dynowski, M. (2009). Plant aquaporin selectivity: where transport assays, computer simulations and physiology meet. *Cell Molecular Life Science*, v. 66, p. 3161-3175.
- Maeshima, M.; Ishikawa, F. (2008). ER membrane aquaporins in plants. *European Journal of Physiology*, v. 456, p. 709-716.
- Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, v. 298, p. 1912-1934.
- Meinke, D. W.; Cherry, J. M.; Dean, C.; Rounsley, S. D.; Koonneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science*, v. 282, p. 662-682.
- Mitsuda, N.; Ohme-Takagi, M. (2009). Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, v. 50, p. 1232-1248.
- Osborne, C. P.; Beerling, D. J. (2006). Nature's green revolution: the remarkable evolutionary rise of C4 plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences*, v. 361: 173-194.
- Peterhansel, C. (2011). Best practice procedures for the establishment of a C4 cycle in transgenic C3 plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, 3011-3019.
- Porcel, R.; Azcón, R.; Ruiz-Lozano, J. M. (2005). Evaluation of the role of genes encoding for dehydrin proteins (LEA D-11) during drought stress in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, p. 1933-1942.
- Qiu, Q.-S.; Guo, Y.; Dietrich, M. A.; Schumaker, K.S.; Zhu, J.-K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, p. 8436-8441.

- Raines, C. A. (2006). Transgenic approaches to manipulate the environmental responses of the C3 carbon fixation cycle. *Plant Cell Environment*, v. 29, p. 331-339.
- Riechmann, J.L.; Herad, J.; Martin, G.; Reuber, L.; Jiang, C-Z.; Keddie, J.; Adam, L.; Pineda, O.; Ratcliffe, O.J.; Samaha, R.R.; Creelman, R.; Pilgrim, M.; Broun, P.; Zhang, J. Z.; Ghandehari, D.; Sherman, B. K.; Yu, G. (2010). Arabidopsis transcription factors genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, v. 290, p. 2105-2110.
- Romero, I.; Fuertes, A.; Benito, M.J.; Malpica, J.M.; Leyva, A.; Paz-Ares, J. (1998). More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, v. 14, p. 273-284.
- Rontein, D.; Basset, G.; Hanson, A.D. (2002). Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metabolic Engineering*, v4, p. 49-56.
- Sage, R. F. (2004). The evolution of C4 photosynthesis. *New Phytologist*, v. 161, p. 341-370.
- Sage, R. F.; Zhu, X.-G. (2011). Exploiting the engine of C4 photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, 2989-3000.
- Saijo, Y.; Hata, S.; Kyojuka, J.; Shimamoto, K.; Izui, K. (2000). Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant Journal*, v. 23, p. 319-327.
- Santos, P.B.; Soares-Cavalcanti, N.M.; Vieira-Mello, G.S.; Wanderley-Nogueira, A. C.; Calsa-Junior, T.; Benko-Iseppon, A.M. (2009). In Silico Evaluation of Osmoprotectants in *Eucalyptus* Transcriptome. *Lecture Notes in Computer Sciences*, v. 5488, p. 66-77.
- Santos, P.B, Soares-Cavalcanti, N.M.; Vieira-de-Melo, G.S.; Benko-Iseppon, A.M. (2011). Osmoprotectants in the Sugarcane (*Saccharum* spp.) Transcriptome Revealed by In Silico Evaluation. *Lecture Notes in Computer Science*, v. 6685, p. 44-58.
- Seki, M.; Narusaka, M.; Ishida, J.; Nanjo, T.; Fujita, M.; Oono, Y.; Kamiya, A.; Nakajima, M.; Enju, A.; Sakurai, T.; Satou, M.; Akiyama, K.; Taji, T.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Carninci, P.; Kawai, J.; Hayashizaki, Y.; Shinozaki, K. (2002). Monitoring the expression profiles of 7,000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal*, v. 31, p. 279-292.
- Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Seki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 6, p. 410-417.
- Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K.

- (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, p. 221-227.
- Silva, R.L.O.; Ferreira Neto, J.C.R.; Pandolfi, V.; Chabregas, S.M.; Burnquist, W.L.; Benko-Iseppon, A.M.; Kido, E.A. (2011) *Transcriptomics of Sugarcane Osmoprotectants under Drought*. In: Vasanthaiyah, H.K.N., Kambiranda, D. (Eds.) *Plants and Environment*. 1st Ed., Rijeka, Intech, p.p.89-114.
- Singh, K. B.; Foley, R. C.; Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress response. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 5, p. 430-436.
- Soares-Cavalcanti, N.M.; Wanderley-Nogueira, A.C.; Belarmino, L.C.; Barros, P. S.; Benko-Iseppon, A.M. (2009). Comparative in silico evaluation of MYB transcription factors in eucalyptus, sugarcane and rice transcriptomes. *Lecture Notes in Computer Sciences*, v. 5488, p. 44-55.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, v. 408, p. 796-815.
- Vandepoele, K.; Quimbaya, M.; Casneuf, T.; De Veylder, L.; Van de Peer, Y. (2009). Unraveling transcriptional control in arabidopsis using cis-regulatory elements and coexpression networks. *Plant Physiology*, v. 150, p. 535-546.
- Vincent, J.L.; Brewin, N.J. (2000). Immunolocalization of cysteine protease in vacuoles, vesicles, and symbiosomes of pea nodule cells. *Plant Physiology*, v. 123, p. 521-530.
- Voznesenskaya, E.V.; Franceschi, V.R.; Kiirats, O.; Freitag, H.; Edwards, G.E. (2001). Kranz anatomy is not essential for terrestrial C4 plant photosynthesis. *Nature*, v. 414, p. 543-546.
- Wang, W.; Vinocur, B.; Shoseyov, O.; Altman, A. (2004a). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, v. 9, p. 244-252.
- Wang, Y.; Ying, Y.; Chen, J.; Wang, X. (2004b). Transgenic *Arabidopsis* overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. *Plant Science*, v. 167, p. 671-677.
- Wang, Z.; Libaut, M.; Joshi, T.; Valliyodan, B.; Nguyen, H. T.; Xu, D.; Stacey, G.; Cheng, J. (2010). SoyDB: a knowledge database of soybean transcription factors. *BMC Plant Biology*, v. 10, p. 14-25.
- Wellmer, F.; Riechmann, J. L. (2005). Gene network analysis in plant development by genomic technologies. *International Journal*

of *Developmental Biology*, v. 49, p. 745-759.

Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*, v. 57, p. 781-803.

Yancey, P. H. (2001). Water stress, osmolytes and proteins. *Integrative and Comparative Genomics*, v. 41, p. 699-670.

Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other

stresses. *The Journal of Experimental Biology*, v. 208, p. 2819-2830.

Yang, Q.; Chena, Z.-Z.; Zhoua, X.-F.; Yina, H.-B.; Lia, X.; Xina, X.-F.; Honga, X.-H.; Zhuc, J.-K.; Gongga, Z. (2009). Overexpression of *SOS* (Salt Overly Sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, v. 2, p. 22-31.

Zagdanska B, Wisniewski K. (1996) Endoproteinase activities in wheat leaves upon water deficit. *Acta Biochimica Polonica*, v. 43, p. 515-519.