

ISSN 1516-8840

Dezembro, 2010

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Clima Temperado
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 307

Ácido Abscísico e o Estresse Abiótico

Ariano Martins de Magalhães Júnior

Embrapa Clima Temperado
Pelotas, RS
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: BR 392 Km 78
Caixa Postal 403, CEP 96010-971- Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8199
Fax: (53) 3275-8219 - 3275-8221
Home page: www.cpact.embrapa.br
E-mail: sac@cpact.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Ariano Martins de Magalhães Júnior
Secretária- Executiva: Joseane Mary Lopes Garcia
Membros: Márcia Vizzotto, Ana Paula Schneid Afonso, Giovani Theisen, Luis Antônio
Suíta de Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Christiane Rodrigues Congro Bertoldi e
Regina das Graças Vasconcelos dos Santos

Suplentes: Beatriz Marti Emygdio e Isabel Helena Verneti Azambuja

Supervisão editorial: Antônio Luiz Oliveira Heberlê
Revisão de texto: Bárbara Chevallier Cosenza
Normalização bibliográfica: Fábio Lima Cordeiro
Editoração eletrônica e Arte da capa: Sérgio Ilmar Vergara dos Santos
Foto da capa: Ariano Martins de Magalhães Júnior

1ª edição

1ª impressão (2010): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Clima Temperado

Ácido abscísico e o estresse abiótico / editor técnico, Ariano Martins de Magalhães Júnior; autores, Antonio Costa de Oliveira ..., [et al.] – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.
30 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 307).

ISSN 1516-8840

1. Acido abscísico. 2. Estresse abiótico. I. Magalhães Júnior, Ariano Martins de, Ed. II. Oliveira, Antonio Costa. III. Série.

CDD 581.1

© Embrapa 2010

Autor

Antonio Costa de Oliveira

Eng. Agrôn., Dr., professor
do Depto de Fitotecnia, FAEM - UFPel,
Pelotas, RS,
acosta@ufpel.tche.br

Ariano Martins de Magalhães Júnior

Eng. Agrôn., Dr. , pesquisador
da Embrapa Clima Temperado,
Pelotas, RS,
ariano.martins@cpact.embrapa.br

Carla Ferreira Silveira

Bacharel em Química, Mestranda em Biotecnologia
do Centro de Desenvolvimento Tecnológico – UFPel,
Pelotas, RS,
csilveira_iqq@ufpel.tche.br

Eugenia Jacira Bolacel Braga

Bióloga, Dr^a., professora
do Depto de Botânica, Instituto de Biologia – UFPel,
Pelotas, RS,
eugenia@ufpel.edu.br

Gabriela de Magalhães da Fonseca

Eng. Agrôn., Doutoranda em Agronomia
do Depto de Fitotecnia, FAEM – UFPel,
Pelotas, RS,
gabrieladafonseca@hotmail.com

Letícia Carvalho Benitez

Bióloga, M.^{sc.}, Doutoranda em Fisiologia Vegetal,
do Depto de Botânica, Instituto de Biologia – UFPel,
Pelotas, RS,
lecbenitez@gmail.com

Luciano Carlos da Maia

Eng. Agrôn., Dr. Professor
do Depto de Fitotecnia, FAEM – UFPel,
Pelotas, RS,
lmaia.faem@ufpel.edu.br

Viviane Köpp da Luz

Eng. Agrôn., M.^{sc.}, Doutoranda em Agronomia,
do Depto de Fitotecnia, FAEM – UFPel,
Pelotas, RS,
vivikp05@hotmail.com

Apresentação

Um dos principais problemas na agricultura é a presença de condições ambientais desfavoráveis para a sobrevivência e produtividade dos vegetais. Essas condições indesejadas, tais como a deficiência de água, alta concentração de sais no solo, temperaturas supra e infra-ótimas e ainda níveis elevados de radiação, podem causar efeitos que diminuem, significativamente, a produtividade de várias espécies de importância agrícola e caracterizando o chamado estresse abiótico.

O ácido abscísico (ABA) é o hormônio de maior importância na relação estabelecida entre as plantas e as várias classes de estresse. Sistemas de sinalização constituem redes de comunicação entre rotas metabólicas distintas que interagem através de elementos promotores e fatores de transcrição, ativando a expressão de genes e resultando em alterações fisiológicas para tolerância ao estresse. Diferentes caminhos de transdução de sinais foram postulados para rotas que apresentam interação com ABA, caminhos independentes da presença de ABA e um caminho onde estão presentes genes responsivos às duas condições (*cross-talk*).

Mudanças bioquímicas e fisiológicas têm uma relação de causa-efeito com as características morfológicas em plantas e, primordialmente, o funcionamento desses mecanismos tem base genética e molecular. A

partir desse pressuposto, é possível prever que genótipos com tolerância a determinado estresse apresentem diferenças qualitativas ou quantitativas em sua base genética.

Desta forma, compreender as bases bioquímicas, fisiologias e a integração desses conhecimentos com a biotecnologia e genômica poderá resultar na principal ferramenta para o avanço no entendimento sobre a tolerância das plantas frente a essas condições.

Waldyr Stumpf Junior
Chefe-Geral
Embrapa Clima Temperado

Sumário

Introdução.....	9
A evolução sob condições de estresse.....	10
Melhoramento genético de plantas.....	10
Ácido abscísico.....	11
Funções fisiológicas do ABA.....	13
O ABA como hormônio do estresse.....	15
Genes ABA-dependentes e ABA-independentes.....	15
Transdução de sinais ABA-dependente.....	16
Fatores de transcrição ABA-dependentes.....	17
Transdução de sinais ABA-independente.....	20
<i>Cross-talk</i>	22
Mensageiros secundários relacionados ao ABA e ao estresse abiótico.....	23
Expressão de produtos relacionados ao ABA e ao estresse abiótico.....	25
Regulação de genes ABA.....	25
Considerações Finais.....	26
Referências Bibliográficas.....	27

Ácido Abscísico e o Estresse Abiótico

Ariano Martins de Magalhães Júnior

1. Introdução

O arroz, um dos cereais mais cultivados no mundo, ocupa posição de destaque do ponto de vista econômico e social. Está presente principalmente em países em desenvolvimento, servindo como alimento básico. Além de ser uma cultura extremamente versátil, pois se adapta a diferentes condições de solo e clima, é considerada a espécie com maior potencial no aumento de produção para o combate à fome no mundo (GOMES; MAGALHÃES JUNIOR, 2004). O programa de melhoramento genético da Embrapa, em arroz irrigado (*Oryza sativa* L.), tem como objetivo principal o desenvolvimento de genótipos que proporcionem alto potencial de produtividade, entretanto busca, concomitantemente, caracteres como qualidade industrial, resistência a pragas e moléstias (estresses bióticos) e tolerância ao frio, salinidade, toxidez por alumínio ou ácidos orgânicos (estresses abióticos), características fundamentais para o ganho genético na espécie e resistência a moléstias. A produtividade é expressa em função da interação do genótipo da cultivar com o ambiente da região onde é cultivada. Estresses abióticos durante as fases críticas da planta predisõem à queda de rendimento, além disso, são os principais responsáveis por provocar mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares afetando adversamente o crescimento e desenvolvimento vegetal (WANG et al., 2001).

A evolução sob condições de estresse

Algumas teorias indicam que as primeiras estruturas de membranas fosfolípídicas tenham ocorrido há 1,5 bilhões de anos após o surgimento do planeta, entretanto, estimativas indicam que o mais antigo ancestral dos vegetais demorou mais de três bilhões de anos para surgir (LEHNINGER et al., 1995).

Certamente, o grande espaço evolutivo entre a primeira membrana e o primeiro ancestral das plantas é devido ao tempo necessário para a criação do aparato estrutural que constituía essas membranas celulares. Somente a partir do desenvolvimento dessas estruturas, da capacidade em receber e transferir sinais intra e extracelulares vinculados a fatores externos e da capacidade de reagir contra essas adversidades é que se iniciou o processo de migração das espécies do ambiente marinho para as regiões litorâneas.

As grandes alterações que a Terra sofreu, como alterações de temperatura, presença ou ausência de altas e baixas concentrações de sais, diferentes níveis de radiação e alterações nas concentrações de gases na atmosfera, supostamente dirigiram a criação e seleção de genes relacionados a esses fatores de estresse.

Considerar esses possíveis fatos evolutivos pode ser um caminho para explicar a estreita relação existente entre os mecanismos atuais que as plantas utilizam frente a situações extremas com a conversão em rotas metabólicas e sistemas de sinalização de moléculas em comum, como o ácido abscísico, presente em grande quantidade em todas as classes de estresse abiótico.

Melhoramento Genético de plantas

Do ponto de vista prático, a seleção de genótipos que apresentem mutações ou recombinações nos genes envolvidos na tolerância a estresses abióticos é de grande valia, pois se estas diferenças forem expressas em melhoria, possivelmente esses genes podem ser transferidos

para cultivares comerciais, possibilitando a obtenção de genótipos mais produtivos. Entretanto, em programas de melhoramento convencional, onde grandes quantidades de cruzamentos são realizados em busca de novas formas desses genes, a detecção dessas diferenças nas grandes populações segregantes, oriundas desses cruzamentos, muitas vezes é ineficiente, porque pode ocorrer um mascaramento dos dados fenotípicos pela não ocorrência do fator estresse ou, ainda, por vários outros fatores genéticos que dificultam a identificação desses genes ou alelos.

Atualmente, é bastante rotineiro o uso de marcadores moleculares associados a caracteres de interesse em programas de melhoramento, sendo uma importante estratégia, uma vez que possibilita a identificação das formas alternativas de genes ou alelos, excluindo o efeito do ambiente e constituindo a chamada seleção assistida.

Desta forma, identificar genes ou alelos alternativos em populações de plantas, ou ainda buscar em bancos de dados genômicos informações atualizadas sobre genes relacionados ao ácido abscísico e estresse abiótico, pode prover a inclusão de novos marcadores moleculares a serem utilizados na seleção genética assistida.

Ácido abscísico

O ácido abscísico é um fitormônio encontrado em todas as plantas vasculares, sendo também detectado em musgos. É encontrado na maioria dos tecidos vegetais e sintetizado em todas as células que possuem cloroplastos (TAIZ; ZEIGER, 2004). É um hormônio de extrema importância, pois está relacionado com a regulação de vários processos celulares, tais como a superação da dormência de sementes, transição do estado embrionário para o estado de dormência e crescimento vegetativo, além de exercer funções nas respostas a estresses abióticos e bióticos.

O ácido abscísico (ABA) é sintetizado pela via dos terpenos ou terpenoides (considerado maior grupo de produtos secundários), derivado da rota do ácido mevalônico, que é gerado a partir de três moléculas de acetil-CoA ou em uma segunda rota denominada MEP (metileritritol fosfato). Uma

explicação mais detalhada é mostrada na Figura 1, onde a síntese dos carotenoides acontece a partir do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato, o qual, através das enzimas piruvato e gliceraldeído-3-fosfatosintase, produz isopentenildifosfato (IPP). A molécula de IPP é convertida em um produto de 20 carbonos, geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). O GGPP, mediado pela enzima fitoeno sintase (PSY), é transformado em um carotenoide de 40 carbonos, subseqüentemente, até formar fitoeno. Através da fitoeno desaturase (PDS) este é convertido em caroteno, licopeno, α -caroteno e então a zeaxantina (SEO; KOSHIBA, 2002).

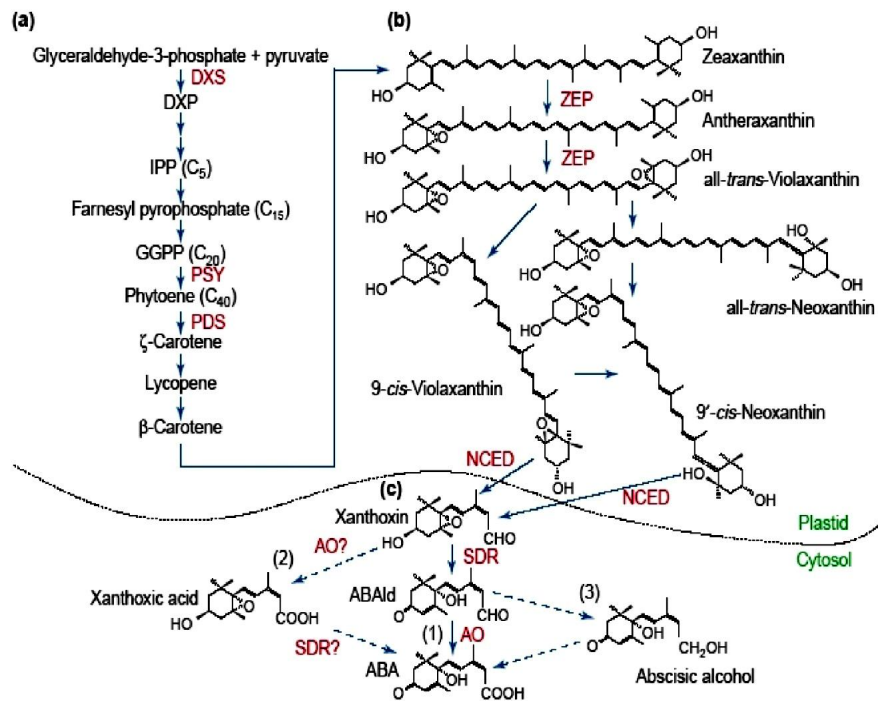


Figura 1. Rota de biossíntese do ABA. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2010. Fonte: Seo e Koshiba, 2002.

Funções fisiológicas do ABA

· No fechamento dos estômatos

Sob condições de estresse hídrico o fechamento dos estômatos é o mecanismo primordial para evitar que as plantas fiquem desidratadas pela transpiração. Um modelo bastante difundido aponta o ABA como principal fator para o desencadeamento de uma série de eventos que resultam no fechamento de estômatos e, conseqüentemente, na tolerância ao estresse hídrico. Em condições de estresse hídrico, alguns tecidos apresentam um acréscimo, de até 50 vezes, na concentração de ABA (TAIZ; ZEIGER, 2004). O processo de translocação do ácido abscísico ainda não está bem elucidado, porque não se sabe quais partes das plantas são as maiores responsáveis pela taxa de incremento nas concentrações de ABA nem como essas moléculas são translocadas de forma tão rápida.

· Na formação das sementes

Durante o desenvolvimento das sementes existe um momento no qual o embrião paralisa a divisão celular e inicia o acúmulo de reservas. Esta transição de fases é correlata com um aumento na concentração de ABA. Durante a maturação da semente ocorrem dois picos no acúmulo de ABA. O primeiro está associado ao tecido embrionário materno que ocorre aos 10 dias após a polinização, e o segundo, num período mais avançado, na fase de maturação, onde o aumento de ABA é provido pela semente ocasionando a desidratação do tecido (FINKELSTEIN; ROCK, 2002).

Na maturação da semente ocorre um acúmulo abundante de proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant proteins*) e carboidratos. O acúmulo de diferentes cadeias de carboidratos e a expressão de genes *LEA* são controlados pela ação de fatores regulados pela presença de ácido abscísico.

Em *Arabidopsis thaliana* foram identificados três mutantes insensíveis à ABA, designados *ABI1*, *ABI2* e *ABI3*. Quando *ABI3* é cruzado com *ABI1* os resultados de deficiências sofrem elevação, sugerindo que nestes

fenótipos a mutação de *ABI3* aumenta a exigência de um limiar para ação de ABA. Nestas plantas foram observadas sementes de cor verde e uma série de defeitos relacionados ao desenvolvimento de sementes, tais como: o acúmulo de proteínas LEA foi drasticamente reduzido, os embriões permaneceram verdes ao longo do desenvolvimento, intolerantes a dessecação e sem dormência. Esses resultados sugerem que o gene *ABI3* é essencial para a síntese de proteínas de armazenamento, regulação da perda de água e maturação da semente (NAMBARA et al., 1992). O sequenciamento dos genes *ABI1* e *ABI2* os indicou como codificantes para duas proteínas fosfatases (serina e treosina) e do *ABI3*, como um fator de transcrição, sendo todos três envolvidos na transdução de sinais.

Além de redução na síntese das proteínas LEA, os mutantes ABA insensíveis também mostraram alterações no conteúdo de carboidratos acumulados durante a formação das sementes, sendo que esta alteração na relação entre monossacarídeos e polissacarídeos pode alterar os mecanismos de perda de água e, conseqüentemente, a dormência das sementes (OOMS et al., 1993).

· Na germinação das sementes

O segundo pico no acúmulo de ABA (origem do próprio tecido da semente) é responsável pela dormência, pois, com o acúmulo das proteínas LEA, ocorre perda de cerca de 80% da água, reduzindo todos os processos metabólicos, sendo este basicamente o mecanismo que induz as sementes ao estado de dormência. A relação entre a concentração ABA e o ácido giberélico nas sementes é o principal fator para a manutenção do estado de dormência, pois o aumento na proporção de ácido giberélico nas sementes é responsável por induzir os processos iniciais da germinação.

A ocorrência de diferentes mecanismos de germinação prematura, em várias espécies, é chamada de viviparidade. Foi observado em milho (*Zea mays*) que plantas mutantes, com deficiência na produção de ABA, apresentaram germinação precoce na espiga (vivíparo).

O gene *Viviparous1 (VP1)*, identificado em milho (*Zea mays*), e o *ABI3*,

identificado em *Arabidopsis*, foram sequenciados e caracterizados como fatores de transcrição homólogos, contendo multidomínios que funcionam como ativadores e repressores, implicando diretamente na sinalização de ABA (SUZUKI et al., 2003).

O ABA como hormônio do estresse

O ABA está intimamente relacionado com a tolerância a várias condições de estresse (choque térmico, seca, salinidade e frio) e a alteração dos padrões de expressão gênica durante o estresse. Muitos genes expressos durante diferentes condições de estresse abiótico são dependentes da presença de ABA, alguns desses, porém, não respondem à aplicação de ABA exógeno. A partir da manipulação de plantas mutantes, com diferentes repostas ao estresse e ao ABA exógeno, foram obtidos grandes avanços na elucidação das rotas metabólicas e dos sistemas de sinalização envolvidos no estresse abiótico.

Análises genômicas e de transcritos indicam que há diferentes sistemas responsáveis pelo controle da expressão gênica durante o estresse, sendo identificadas diferenças nas regiões e/ou nas estruturas dos fatores de transcrição envolvidos na regulação destes genes. Muitos genes induzidos pelo estresse abiótico são controlados pelo ácido abscísico, contudo outros parecem ser regulados por outros fatores (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

Genes ABA-dependentes e ABA-independentes

Vários estudos, a partir de genes com expressão induzida pelo estresse hídrico e por frio, possibilitaram análises em que comparações entre as regiões promotoras (*promoter*) desses genes evidenciaram a presença de diferentes elementos reguladores (descritos como *cis*-atuantes ou *cis*-elementos). Os *cis*-elementos presentes na região promotora dos genes são reconhecidos por proteínas, chamadas fatores de transcrição, as quais interagem de forma específica com esses elementos, criando a estrutura necessária para o início da transcrição do gene.

Foram identificados quatro sistemas independentes de regulação gênica, dois sistemas ABA-dependentes e dois sistemas ABA-independentes. Muitos desses genes são induzidos por diferentes estresses abióticos, sugerindo que existe um sistema de comunicação cruzada (*cross-talk*) entre estes caminhos (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

Transdução de sinais ABA-dependente

Vários genes ABA-dependentes tiveram suas regiões promotoras comparadas entre si, sendo que, em alguns desses genes, foi encontrada uma região conservada apresentando a sequência PyACGTGGC. Esta sequência apresenta homologia com dois genes sequenciados. O primeiro a ser descrito foi o gene *Em*, o qual foi identificado no trigo e é expresso na fase final da maturação das sementes. O segundo gene, *RAB16*, foi identificado em arroz e é expresso em tecidos vegetativos desidratados e nos estágios finais de maturação das sementes. Entretanto, somente após ter sido identificado em *Arabidopsis* é que recebeu o nome de ABRE (ABA-Responsive Element) (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 1997). A sequência em comum nesses genes é descrita como um *cis*-elemento e está presente na região promotora de vários genes responsivos ao ABA. Esses elementos apresentam uma sequência de 8 -10 pares de bases (pb) com um núcleo central ACGT, que forma a região conhecida como *G-box* (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

A presença apenas do elemento ABRE no promotor não é suficiente para ativação da transcrição do gene, sendo necessária a presença de uma segunda estrutura. Em trigo, a presença de elementos CE1 e CE3 tornam os genes *HVA1* e *HVA2* responsivos ao ABA. Em *Arabidopsis*, duas sequências ABRE são necessárias para a expressão do gene *RD29B* em sementes e tecido vegetativo (UNO et al., 2000). O segundo grupo de *cis*-elementos ABA-dependentes foi nomeado CE (*Coupling Element*). Dois desses elementos foram identificados e, apesar de receberem o mesmo nome, não apresentam similaridades entre suas sequências. O primeiro elemento descrito foi o CE1 (TGCCACCGG), distante a -44 pb no promotor do gene *HVA22* em cevada (*Hordeum vulgare*). Em análises

posteriores, a partir do gene *HVA1*, foi identificado o segundo elemento, nomeado CE3 (ACGCGTGTC) (SHEN; HO, 1995; HOBBO et al., 1999). Aparentemente, uma dessas sequências pode funcionar como elemento de junção, pois a maioria dos elementos de junção conhecidos é semelhante a ABRE e contém um motivo de A/GCGT. Uma cópia adicional de ABRE, ou outro elemento de junção, é necessária para expressão de genes ABA-dependentes (Figura 2).

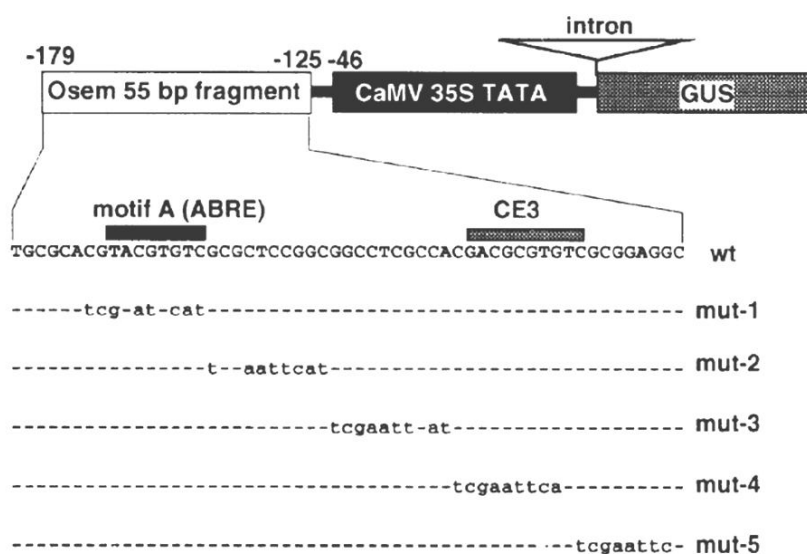


Figura 2. Região promotora em trigo, interação de elementos ABRE e CE3. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2010. Fonte: Hobo et al., 1999.

Fatores de transcrição ABA-dependente

Proteínas que se ligam nas regiões *cis*-elemento, no promotor de um gene, são chamadas de fatores de transcrição. Um grupo desses fatores é denominado zíper de leucina (*bZIP-Leucine zipper motif*) e foi caracterizado primeiramente em animais. Em trigo, o gene *EmBP1* foi a primeira sequência caracterizada com domínio bZIP e que se liga a elementos do tipo ABRE.

A partir de cDNAs isolados em *Arabidopsis*, foram caracterizadas três proteínas que se ligam a elementos ABRE. Estas proteínas foram denominadas AREB1, AREB2 e AREB3 (*ABA-Responsive Element Binding Protein*) e apresentam homologia com as proteínas contendo domínio bZIP (UNO et al., 2000).

Estudos de expressão gênica confirmaram que AREB1 e AREB2 são expressos durante estresse hídrico, tratamento com sal e tratamento com ABA exógeno. Entretanto, para AREB3 não foram obtidos dados conclusivos.

Apesar de as proteínas AREB, ou ainda ABF (*ABRE-Binding Factors*), serem consideradas como principais fatores de transcrição nas rotas de transdução de sinais ABA-dependente, outros fatores, conhecidos como MYB e MYC, também fazem parte desta classificação, entretanto estes apresentam interação com outros *cis*-elementos na região promotora dos genes.

Um gene denominado *rd22* (*dehydration-responsive*), isolado de *Arabidopsis*, é responsivo à desidratação e induzido pela aplicação de ABA exógeno (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 1994). Porém, não foi encontrado, em sua região promotora, sequências de elementos AREB, encontradas nos genes responsivos ao ABA, sugerindo a existência de outros reguladores diferentes do AREB e bZIP. Em estudo da região promotora desse gene foi encontrado na posição -67pb sítios de reconhecimento dos fatores de transcrição MYC e MYB (ABE et al., 2003).

MYC (*Myelocytomatosis Oncogene*) e MYB (*Myeloblastosis Oncogene*) são proteínas com estruturas hélice-volta-hélice (*helix-turn-helix*) encontradas em animais e transcritas durante a proliferação celular. Em plantas, várias proteínas MYB estão associadas à regulação de diversos processos, tais como metabolismo secundário, respostas a hormônios e regulação de morfogênese celular (BUCK; ATCHLEY, 2003). Em bibliotecas de cDNA, obtidas a partir de *Arabidopsis* induzidas ao estresse por desidratação, foram identificados fatores de transcrição cujas sequências apresentaram

homologia ao grupo de proteínas MYB e MYC. A resposta desse grupo de fatores de transcrição ao ABA está bem esclarecida, entretanto existem dúvidas quanto à expressão dessas proteínas por elas também estarem associadas à expressão do ácido jasmônico (URAO et al., 1993).

Na Figura 3 são mostrados três *cis*-elementos na rota de sinalização ABA-dependente: ABRE, CE1 e CE2, reconhecidos por fatores de transcrição AREB, além dos elementos MYBR (MYB *recognition sequence*) e MYCR (MYC *recognition sequence*) reconhecidos por fatores MYB e MYC.

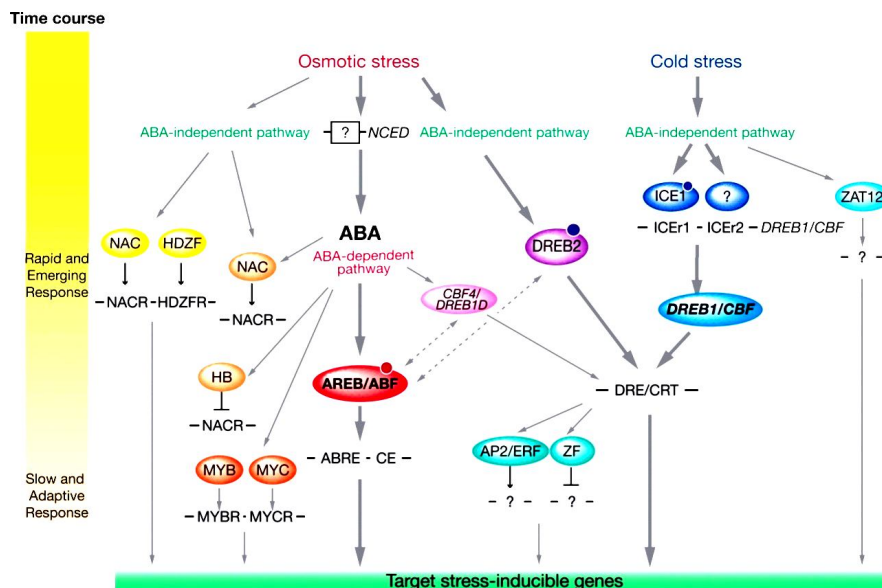


Figura 3. Rede regulatória de fatores de transcrição e *cis*-elementos envolvidos na resposta ao estresse osmótico e por frio. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2010. Fonte: Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006.

Transdução de sinais ABA-independente

· Estresse ao Frio - ABA-independente

Genes expressos sob condições de estresse, contendo em suas regiões promotoras sequências de *cis*-elementos conservadas, denominadas DRE, CRT e LTRE, são considerados os principais genes do sistema de transdução ABA-independente (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

Alguns genes, como *RD29A*, *COR78* e *LT178*, são induzidos pelo déficit de água, pelo frio e por ABA. Esses genes também são induzidos em plantas mutantes ABA-deficientes ou ABA-insensíveis por falta de água e frio. Análises da região promotora desses genes em plantas transgênicas, através de várias alterações em suas sequências, como deleção e inserção de bases, mostraram que uma sequência conservada, de 9 pb, DRE-*Drought Responsive*, é responsável pela regulação do gene *RD29A* nas condições de ABA-independente para desidratação e frio (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 1994).

Um *cis*-elemento semelhante ao elemento DRE foi encontrado em genes expressos durante estresse por frio em *Arabidopsis*. Esse elemento apresentou homologia de cinco nucleotídeos em relação ao elemento DRE, sendo nomeado DRE/CRT (*Dehydration-Responsive Element/C-repeat*) (SAKUMA et al., 2006).

Em bibliotecas de cDNA de *Arabidopsis* sob estresse, foram identificadas três sequências que codificam fatores de transcrição descritos como CBF1 (*C-Repeat Binding Factor*), DREB1A e DREB2A (*Dehydration Responsive Element Binding Factor*), os quais se ligam aos *cis*-elementos DRE/CRT (LEE et al., 2005).

Um fator de transcrição denominado ICE1 (*Induced of CBF expression 1*) foi caracterizado em *Arabidopsis*. A cascata de sinalização do ICE1 está um nível acima (*upstream*) do fator CBF3, sendo o responsável por ativar sua expressão durante tratamento ao frio. Mutantes *ice 1* bloqueiam a

sinalização do CBF3, entretanto não bloqueiam os homólogos CBF1 ou CBF2 (LEE et al., 2005).

Após a regulação de CBF/DREB1, o qual sinaliza para DRE/CRT, ocorre regulação na expressão de AP2/ERF (fatores de transcrição *Zinc-Finger*), os quais regulam a expressão em um nível abaixo na cascata de sinais. Embora as etapas de sinalização que acionam o ICE1 acima do grupo dos fatores CBF ainda não estejam esclarecidas, muitos estudos estão sendo realizados devido ao grande efeito que ele promove na sinalização.

· **Estresse hídrico - ABA- independente**

O grupo de genes expressos durante estresse hídrico, não responsivo ao frio e tratamento com ABA exógeno, evidencia a existência de uma segunda via de transdução ABA-independente. Esse grupo inclui o gene *ERD1* (*Early Responsive Dehydration 1*), homólogo a uma subunidade proteolítica de uma proteína CLP (*Caseinolytic Protease*) (SIMPSON et al, 2003). O gene *ERD1*, além de ser induzido através de desidratação, também sofre sub-regulação durante a senescência natural e/ou na senescência induzida pela falta de luz (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005). A análise da região promotora do *ERD1* revelou a presença de quatro *cis*-elementos, sugerindo que dois elementos podem ser responsáveis pela expressão dos genes durante desidratação, e os outros dois elementos, durante a senescência natural ou senescência induzida pela falta de luz.

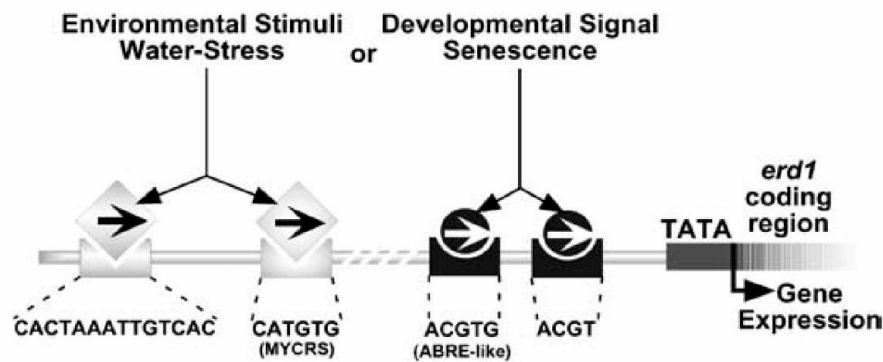


Figura 4. Modelo hipotético para indução do gene *ERD1* durante estresse por desidratação ou durante a senescência. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2010. Fonte: Simpson et al., 2003.

Foram isoladas sequências de cDNAs: *ANAC019*, *ANAC055* e *ANAC072*, homólogas a fatores de transcrição *MYC-like*. Análises em plantas transgênicas revelaram que *ANAC019*, *ANAC055* e *ANAC072* sofrem aumento da expressão durante estresse hídrico, e que as plantas aumentam significativamente sua tolerância à seca, porém a expressão do gene *ERD1* não sofre alteração. Em estudos posteriores foram isolados cDNAs que codificam proteínas ZFHD (*Zinc-Finger Homeodomain*) e NAC NAM/ATAF1/2/CUC). A sobre-expressão dessas proteínas aumentou a expressão de *ERD1*, indicando que esses *cis*-elementos são necessários para expressão do gene *ERD1*.

Cross-Talk

A interação entre genes com diferentes elementos reguladores nos promotores, expressos durante as diferentes classes de estresse, responsivos ao ABA, aos demais fitormônios e durante a presença de espécies reativas de oxigênio (ROS), denomina-se *cross-talk* (conversa cruzada), pois vários desses genes são regulados por diferentes rotas de transdução de sinais, sinalizados em resposta à tensão das diferentes classes de estresse. O termo *cross-talk* é usado para descrever situações em que a sinalização de diferentes redes gênicas e rotas metabólicas compartilha um ou mais componentes intermediários, ou quando há

produção em comum (CHINNUSAMY et al., 2003).

Foram observadas interações no promotor do gene *RD29A*, no qual foram encontrados elementos DRE e ABRE. Outro exemplo de *cross-talk* foi observado durante estresse hídrico, na rota de expressão do gene *RD22*, o qual é controlado por fatores de transcrição com domínio MYB, induzido por ABA, porém também envolvidos em resposta ao ácido jasmônico (YAMAGUCHI- SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

Mensageiros secundários relacionados ao ABA e ao estresse abiótico

· Cálcio (Ca^{++})

Além das rotas, já elucidadas, da ação do Ca^{++} no fechamento de estômatos, o cálcio é considerado o ponto de partida na sinalização em cascata e *cross-talk* em todas as classes de estresse abiótico, pois a ação do ABA está vinculada às alterações na concentração de cálcio no citosol das células.

Considerado mensageiro secundário, estudos sobre o cálcio mostram que a fluidez da membrana e a reorganização do citoesqueleto são alteradas em conjunto com a oscilação de Ca^{++} no citosol de alfafa durante estresse por frio.

· Inositol 1,4,5-Trifosfato (IP_3)

A expressão de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), mensageiro responsável pela sinalização da abertura dos canais de cálcio durante estresse osmótico, é alterada com a presença de ABA (TAIZ; ZEIGER, 2004). A função do IP_3 foi primeiramente descrita como modelo de sinalização, baseado em células animais. Entretanto, em estudos com *Arabidopsis*, o gene *FRY1*, que codifica para inositol polifosfato 1-fosfatase (altera o acúmulo de IP_3), gerou oscilações na concentração de Ca^{++} citosólico em função da aplicação de ABA, e de estresses por salinidade e por frio (CHINNUSAMY et al., 2003).

· ***Salt-Overly-Sensitive (SOS)***

Durante a sinalização sob estresse salino em *Arabidopsis*, foram identificadas sequências de genes *SOS1*, *SOS2* e *SOS3* responsivas ao estresse iônico, descritas como *Salt-Overly-Sensitive (SOS)*. Essas sequências apresentaram homologia com proteínas que contêm sítio catalítico serina/treonina e estão envolvidas na homeostase da célula durante estresse osmótico e por frio (CHINNUSAMY et al, 2003).

· ***Calcium-dependent protein kinases (CDPK)***

Proteínas kinases dependentes de cálcio (CDPK - *Calcium-Dependent Protein Kinases*) compõem uma grande família de proteínas, presentes nos vegetais, envolvidas na transdução de sinais em várias rotas durante o estresse abiótico e alterações na concentração de ABA.

· ***Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)***

Proteínas MAPK estão envolvidas em várias rotas do metabolismo vegetal, como hormônios, estresses bióticos e abióticos. Em *Arabidopsis*, dois genes *MAPK (AtMPK4 e AtMPK6)* têm expressão alterada pelo frio, salinidade e estresse hídrico, indicando a importância dessas proteínas durante situações de estresse. Além disso, MAPKK e MAPKKK também são ativadas em cascata pela MAPK em resposta a estresses (BOUDSOCQ; LAURIERE, 2005).

· ***SNRK2***

Genes *SnRK2* isolados em *Arabidopsis*, expressos durante estresse hídrico, foram preditos com função Kinase e apresentam sequências homólogas a proteínas SPK presentes em soja. A expressão dos genes *SnRK2* também foi comprovada com a aplicação de ABA exógeno. Foi sugerido que, durante o estresse, proteínas SnRK2 são expressas a partir da percepção de ABA e espécies reativas de oxigênio (*ROS-Reactive oxygen species*) (BOUDSOCQ; LAURIERE, 2005).

Expressão de produtos relacionados ao ABA e ao estresse abiótico

Vários genes estão descritos como transcritos durante estresse abiótico ou tratamento com ABA exógeno. Os produtos desses genes são classificados em dois grupos: funcionais e regulatórios.

Dentre as proteínas funcionais estão: aquaporinas (canais de água), enzimas necessárias na biossíntese de várias substâncias de proteção osmótica (carboidratos, prolina e betaína); proteínas protetoras de macromoléculas, LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) e chaperonas; proteases, responsáveis por eliminar proteínas indesejadas durante o estresse (CLP protease e ubiquitina); além de enzimas necessárias para a desintoxicação do citosol (glutathione S-transferase, superóxido dismutase e ascorbato peroxidase). Chaperonas e LEA são famílias proteicas envolvidas nas respostas à tolerância a estresses abióticos em plantas, como altas temperaturas, salinidade e estresse hídrico, que podem causar a desnaturação e perda de função de muitas proteínas, pois a perda de água do citosol promove aumento na concentração de sais e alterações de pH. As chaperonas e outras HSP (*Heat-shock protein*) são proteínas menores que interagem com a superfície de proteínas maiores, impedindo que a alteração osmótica do meio altere as características dessas proteínas, caracterizando um mecanismo de defesa perante o estresse. As proteínas LEA foram caracterizadas primeiramente durante a fase final do desenvolvimento do embrião. A expressão dessas proteínas sob estresse ou presença de ABA está associada a mecanismos de tolerância (TAIZ; ZEIGER, 2004; VINOUCUR; ALTMAN, 2005).

No grupo das proteínas regulatórias encontram-se genes que codificam fatores de transcrição envolvidos na transdução de sinais em resposta ao estresse, tais como as famílias kinase mencionadas, fosfolipases e enzimas para a síntese de ABA (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 1997).

Regulação de genes ABA

O aumento das concentrações de ABA em plantas durante a exposição ao

estresse está relacionado diretamente com o incremento na expressão de genes que codificam proteínas e enzimas envolvidas na rota de biossíntese do ABA. Vários estudos comprovam esse fato. A partir de plantas mutantes foi possível identificar paralisações em vários pontos da rota biossintética do ABA. Muitos exemplos de mutações envolvendo genes que participam da biossíntese do ABA foram publicados.

O gene *ZEP* (*Zeaxantina epoxidase*) foi o primeiro a ser estudado. Esse gene foi isolado de algumas plantas mutantes de *Arabidopsis*, *Nicotiana plumbaginifolia* e *Oryza sativa*, as quais apresentaram acúmulo de zeaxantina e redução no conteúdo de ABA (NAMBARA; MARION-POLL, 2005). Em algumas plantas de milho ocorrem mutações descritas como viviparidade. Nestes casos as sementes não apresentam dormência, podendo germinar ainda na espiga, e as plantas não toleram estresse hídrico. No mutante *vp14* (*viviparous14*) foi observado que a mutação provocou perda na função da enzima NCED (9-cis-epoxicarotenoide-deoxidase), responsável pela formação de precursores do ácido abscísico na rota dos carotenoides.

Considerações Finais

O conhecimento do impacto de estresses abióticos em plantas e o envolvimento do hormônio ácido abscísico na interação com esses fatores é um dos principais focos da biotecnologia vegetal moderna. Progressos em genômica e biologia molecular caracterizam uma poderosa ferramenta para incrementar esse conhecimento.

Em projetos de melhoramento genético vegetal, os quais envolvem grande quantidade de genótipos, o uso de algumas técnicas de biologia molecular é inviável. A utilização de seleção assistida por marcadores moleculares derivados destes estudos pode aumentar a eficiência na identificação de diferenças associadas aos genes envolvidos na tolerância ao estresse abiótico.

A busca de mutações nas diversas rotas metabólicas associadas às sinalizações dependentes do ABA certamente resultam em genótipos com

diferentes comportamentos em relação ao estresse, contudo a revisão da literatura citada neste trabalho mostra que possivelmente indivíduos ABA-mutantes apresentem perdas de características importantes associadas a outros caminhos sinalizados pelo hormônio.

Referências Bibliográficas

ABE, H.; URAO, T.; ITO, T.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. **The Plant Cell**, Waterbury, US, v. 15, p. 63-78, 2003.

BOUDSOCQ, M.; LAURIERE, C. Osmotic signaling in plants: multiple pathways mediated by emerging kinase families. **Plant Physiology**, Urbana, US, n. 138, v. 3, p. 1185-1194, 2005.

BUCK, M. J.; ATCHLEY, W. R. Phylogenetic analysis of plant basic helix-loop-helix proteins. **Journal of Molecular Evolution**, Chicago, US, v. 56, p. 742-750, 2003.

CHINNUSAMY, V.; OHTA, M.; KANRAR, S.; LEE, B. H.; HONG, X.; AGARWAL, M.; ZHU, J. K. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. **Genes Development**, New York, US, n. 17, p. 1043-1054, 2003.

FINKELSTEIN, R. R.; ROCK, C. D. Abscisic acid biosynthesis and response. In.: SOMERVILLE, C. R.; MEYEROWITZ, E. M. (Ed.). **The Arabidopsis Book**, Rockville, MD, 2002, p 1-52.

GOMES, A. da S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. (Ed.). **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 899 p.

HOBO, T.; ASADA, M.; KOWYAMA, Y.; HATTORI, T. ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. **Plant Journal**, East Lansing, US, v. 19, n. 6, p.679-689, sep. 1999.

LEE, B.H.; HENDERSON, D.A.; ZHU, J.K. The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. **The Plant Cell**, Waterbury, US, v. 17, n. 11, p. 55-75, 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Savier, 1995. 839p.

NAMBARA, E.; NAITO, S.; MCCOURT, P. A mutant of Arabidopsis which is defective in seed development and storage protein accumulation is a new *abi3* allele. **Plant Journal**, East Lansing, US, v. 2, n. 4, p. 435-441, jul. 1992.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, US, v. 56, p. 165-185, 2005.

OOMS, J. J. J.; LEON-KLOOSTERZIEL, K. M.; BARTELS, D.; KOORNNEEF M.; KARSEN, C. M. Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana*: a comparative study using abscisic acid-insensitive *abi3* mutants. **Plant physiology**, Urbana, US, v. 102, n. 4, p. 1185-1191, aug. 1993.

SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Functional Analysis of an Arabidopsis transcription factor. **Trends in Plant Science**, London, UK, v. 10, n. 2, p. 88-94, 2006.

SEO, M.; KOSHIBA, T. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, London, UK, v. 7, n.1, p. 41-48, jan. 2002.

SHEN, Q.; HO, T. H. D. 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. **The Plant Cell**, Waterbury, US, v. 7, n. 3, p. 295-307, mar. 1995.

- SIMPSON, S.D.; NAKASHIMA, K.; NARUSAKA, Y.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. **Plant Journal**, East Lansing, US, v. 33, n. 2, p. 259-270, jan 2003.
- SUZUKI, M.; MATHEW, K.; DONALD R. M. *Viviparous1* alters global gene expression patterns through regulation of abscisic acid signaling through regulation of ABA signaling intermediates. **Plant Physiology**, Urbana, US, v. 132, n. 3, p. 1664-1677, jul. 2003.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 720p.
- UNO, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, DC, v. 97, n. 21, p.11632-11637, 2000.
- URAO, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; URAO, S.; SHINOZAKI, K. An Arabidopsis myb Homolog 1s Induced by Dehydration Stress and Its Gene Product Binds to the Conserved MYB Recognition Sequence. **The Plant Cell**, Waterbury, US, v. 5, n. 11, p. 529-1539, 1993.
- VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**, London, UK, v. 16, n. 2, p. 123-32, 2005.
- WANG, W. X.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. **Acta Horticulturae**, Wageningen, SR, v. 560, p. 285-292, 2001.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A. Novel cis-acting element in an arabidopsis gene 1s involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress. **The Plant Cell**, Waterbury, US, v. 6, p. 251-264, 1994.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, Urbana, US, v. 11, n.5, p. 327-334, 1997.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. **The Plant Cell**, Waterbury, US, v. 18, n. 5, p. 1292-1309, 2005.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, US, v.57, p.781-803, 2006