**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Avaliação fisiológica e agronômica de soja geneticamente modificada
para maior tolerância à seca**

Luana Held Salinet

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia
e Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2009**

Luana Held Salinet
Engenheira Agrônoma

**Avaliação fisiológica e agronômica de soja geneticamente modificada para maior
tolerância à seca**

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO FERRAZ DE OLIVEIRA**

**Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Salinet, Luana Held

Avaliação fisiológica e agrônômica de soja geneticamente modificada para maior tolerância a seca / Luana Held Salinet. - - Piracicaba, 2009.
75 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Água do solo – Disponibilidade 2. Fotossíntese 3. Seca 4. Soja – Fisiologia 5. Plantas transgênicas I. Título

CDD 633.34

S165a

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

*A Deus,
razão da minha existência,
guia dos meus passos por onde for.*

Dedico.

*A minha família,

meus pais, Denise e Francisco,
em especial minha amada mãe,
que me ensinou os valores e
princípios da minha vida,

ao meu irmão Dieder,
pelo apoio e carinho,

todos que com amor e incentivo
me possibilitaram cumprir mais
esta etapa em minha vida.*

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Aos pesquisadores e meus orientadores de fato da Embrapa Soja, José Renato Bouças Farias e Alexandre Lima Nepomuceno, sempre presentes, pelo apoio, oportunidade, confiança, ensinamentos e toda a ajuda despendida para a realização deste trabalho, além da amizade é claro. Em vocês que eu me espelho para estudar e batalhar cada vez mais, para quem sabe um dia eu chegue a ser uma referência profissional, como vocês são para mim.

Ao professor Ricardo Ferraz de Oliveira, por toda a atenção e ensinamentos sobre fisiologia vegetal que agregaram em muito na minha formação, me transformando também numa fanática em comprar livros e ler papers sobre as plantas, para sempre aprender mais e mais.

Ao pesquisador e amigo César de Castro, quem deu os primeiros e muitos passos para eu concretizar esse mestrado, incessantemente me ajudando no que precisasse, alguém com quem eu sempre pude e poderei contar. Eu nunca esquecerei meu primeiro dia como estagiária na Embrapa Soja durante a graduação ainda, quando me perguntou o que gostaria de fazer depois de formada, e eu disse “mestrado em fisiologia na Esalq”, mas não sabia nem como e por onde começar, e desde então, ele foi atrás de mil coisas para me ajudar. Se eu estou concluindo este trabalho hoje, é por causa de você. Obrigada!

À pesquisadora e também amiga Maria Cristina Neves de Oliveira, que me ajudou com todas as análises estatísticas, e que não foram poucas (aquelas pilhas de papéis), nunca medindo esforços para me ajudar, ensinar e explicar, sempre com muita atenção, carinho e dedicação.

Aos colegas e todos os estagiários do Laboratório de Ecofisiologia/Embrapa Soja, por toda a ajuda necessária para a condução dos vários experimentos, principalmente na árdua tarefa de pesar todos os dias aqueles leves vasos naquela fresca casa de vegetação (Claudinei, Everaldo, Adair, Roseli, Delatre, Biólogo, Hugo, Vinícius, Rafael, Germano, Juliano entre outros). Também às meninas do Laboratório

de Biotecnologia Vegetal/Embrapa Soja, sempre prontas a ajudar no que fosse preciso (Adriana Polizel, Renata Stolf, Magda e Amanda).

Aos também colegas do Laboratório de Plantas Cultivadas sob Condição de Estresse/Esalq, pela grande amizade e ajuda quando necessário, fazendo do nosso ambiente de estudo diário mais agradável e divertido de se conviver (Rafael Vivian, Evandro, Juliana, Dona Eva, Rodrigo, Lúcio, Prozaq, Ainid entre outros).

À Maria Solizéte, secretária do programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, a Luciane, do de Fitotecnia, e ao professor Ricardo Kluge, pela amizade e disposição no que precisasse.

Às instituições Embrapa Soja, *Jircas*/Japão e Esalq/USP por possibilitarem a realização deste trabalho e aos funcionários pela colaboração e apoio recebido.

Enfim, aos muitos brilhantes e amados amigos que fiz durante esses anos aqui em Piracicaba, fazendo com que esse período fosse muito mais alegre, divertido, gostoso e feliz de se viver. Para mim, a melhor época vivida, com certeza, que sentirei eternas saudades. Embora sejam muitas as pessoas a quem me refiro, algumas não poderia deixar de citar: Fernanda, Arrombado, Ainid, Dieta, Frijéus, Cópula, Anrelita, Kutrale e Gabi, Thais e Paula, todos da República Copacabana: Maguiliña, Ximbas, Galaq, Subako, Travado, Virtual, Vaza, Txarlie, Pitomba, Ramalhão “a força e tradição da amizade esalqueana” - , K-labouço: Maridão, K-já, Xera-Meia, Franq, Trãnstorno, K-pueira - , K-zona: Garga, Tamburelo, Muskito, Paizinho, Purifiq, Z-itona, Napoleão, Asnézio - , Perdição: Tititi, Mindigo, Boi, Treme-xão, Robado, Pulgão - , Gamei, Ivý, Joice, Dilúvio, Gabi....Vocês são formidáveis, estão no coração e nunca os esquecerei!

“O aprendizado nunca termina. Não existe parte da vida que não contenha lições. Se você está vivo, há lições para aprender”.

(Autor desconhecido)

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
LISTA DE SÍMBOLOS	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 Revisão bibliográfica.....	17
2.2 Material e métodos	29
2.2.1 Material vegetal e condições de cultivo	29
2.2.2 Tratamentos e desenho experimental	30
2.2.3 Medições	32
2.2.4 Análise estatística	33
2.3 Resultados e Discussão	33
2.3.1 Avaliações fisiológicas	33
2.3.2 Avaliações agronômicas.....	52
2.3.3 Modelo matemático	59
3 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS	74

RESUMO

Avaliação fisiológica e agronômica de soja geneticamente modificada para maior tolerância à seca

A soja é uma das culturas com maior importância sócio-econômica no mundo, visto o complexo agro-industrial que movimenta. A ocorrência de períodos de seca durante a estação de desenvolvimento das lavouras de soja é muito freqüente, provocando reduções drásticas na produtividade. Sendo a seca um fator limitante de produção fora do controle direto do homem, e a necessidade de suprir a demanda mundial crescente de alimentos, fazem com que a estabilidade da produtividade seja a chave para este entrave. O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas e agronômicas de dois genótipos de soja, um geneticamente modificado contendo a construção *rd29A:DREB1A*, visando maior tolerância à seca, e sua isolínea convencional, comparando-as frente a diferentes condições de disponibilidade hídrica no solo. Para tal, plantas de soja foram transformadas com o cassete *rd29A:DREB1A*, ambos elementos de *Arabidopsis thaliana*, introduzido por biobalística. O efeito da super expressão do gene *AtDREB* sobre parâmetros fisiológicos e agronômicos foi avaliado em casa de vegetação em três cultivos. Os experimentos foram instalados em blocos casualizados em arranjo fatorial (2x2), com quatros blocos e três amostras por bloco, e os resultados submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para comparações múltiplas das médias. Foram utilizadas sementes da cultivar BR16 transformada com a construção *rd29A:DREB1A*, nomeadas P58, e sementes BR16 não transformadas. As plantas foram submetidas à duas condições de disponibilidade hídrica: 15% de umidade gravimétrica do solo (UG) durante todo o ciclo (controle) e 2,5% de UG (tratamento sob estresse) a partir de R1/R2 (florescimento). Foram avaliadas as taxas fotossintética e transpiratória, condutância estomática e diferença de temperatura entre o ar e a folha com o medidor de trocas gasosas LI-6400 (Li-Cor ®), além da eficiência fotossintética e parâmetros agronômicos. Para condutância estomática, diferença de temperatura, taxas fotossintética e transpiratória, as maiores médias foram verificadas nas plantas sob 15% de UG e, dentro desta umidade, das plantas P58 em relação às BR16 geralmente. No tratamento sob estresse (2,5% de UG), as plantas transgênicas mantiveram valores superiores em praticamente todas as avaliações e, quando não, apresentaram valores que não diferiam estatisticamente das BR16. A eficiência fotossintética foi maior nas plantas P58 apenas nas avaliações finais e para as mesmas UG, e iguais estatisticamente nas demais avaliações. Para as avaliações agronômicas, as plantas BR16 apresentaram as maiores alturas em ambas as umidades, embora o mesmo número de nós que as P58. Para peso da parte aérea, número de sementes e número de legumes com semente e peso de semente, os maiores valores foram das plantas a 15% de UG e, dentro destas, das BR16. Os resultados indicam que a expressão da construção com o gene *DREB1A* confere maior tolerância à seca das plantas transgênicas, baseado em respostas fisiológicas, embora o desempenho agronômico deva ainda ser comprovado a campo.

Palavras-chave: *Glycine max*; Fisiologia; Fotossíntese; *DREB*; *rd29A*; Soja transgênica; Estresse hídrico; Déficit hídrico

ABSTRACT

Physiologic and agronomic evaluation of genetically modified soybean to improve drought tolerance

Soybean is one of the major socio-economic important crops in the world due to the agro-industrial complex involved. The occurrence of drought during the period of development of soybean fields is very frequent, resulting in drastic yield decrease. As the drought being one limiting factor in the yield without human direct control, and the necessity of supplying the growing world food demand, keeping the stability of the yield seems to be the key for this problem. The objective of this study was to evaluate the physiologic and agronomic response of two soybean genotypes; one genetically modified containing the construction *rd29A:DREB1A*, aiming drought tolerance, and its conventional isolate, comparing them in different conditions of soil water availability. Soybean plants were transformed with the cassette *rd29A:DREB1A*, both elements of *Arabidopsis thaliana*, introduced by bioblastic method. The overexpression effect of *AtDREB* on physiologic and agronomic parameters was evaluated in greenhouse conditions during three cultivations. The experiment design used was the RBD (Randomized Blocks Design) in factorial scheme (2x2), with four blocks and three samples for block, and the results were submitted to the Analyze of Variance (ANOVA) and to the Tukey test ($p \leq 0,05$) of multiples means comparisons. Transformed BR16 cultivar seeds were used with the construction *rd29A:DREB1A*, named P58, and seeds of no-transformed BR16 cultivars. The plants were submitted to two conditions of water availability: 15% of soil gravimetric humidity (GH) during all the experiment time (control) and 2,5% of GH (stress treatment) starting from R1/R2 (flowering stage). Photosynthetic and transpiration rates, stomatal conductance and temperature difference between the air and the leaf were measured with a portable open gas exchange system (LI-6400; Li-Cor ®), besides the photosynthetic efficiency and agronomic parameters, between nine and eleven-thirty in the morning. For stomatal conductance, temperature difference, photosynthetic and transpiration rates, the higher values were verified in the plants under 15% of GH and, within this humidity, these higher values were usually verified in plants P58 in relation to the BR16 plants. In the treatment under stress (2,5% of GH), the transgenic plants maintained higher values in almost all measurements and, when it did not occur, they showed values that did not differ statistically of the BR16 plants. The photosynthetic efficiency was higher in the P58 plants only in the final measures; and for the same GH, and statistically equal in the others measures. For the agronomic evaluations, the BR16 plants showed the highest heights in both humidities, even though they had the same number of nodes as the P58. For the aerial part weight, the number of seeds and the number of legumes with seed and seed weight, the highest values were of the plants under 15% of GH and, within these, of the BR16 plants in general. The results indicate that the expression of the construction with the gene *DREB1A* leads to a higher drought tolerance of the transgenic plants, based on physiologic response, although they still need tests on the field.

Keywords: *Glycine max*; Physiology; Photosynthesis, *DREB*; *rd29A*; Transgenic soybean, Water stress; Water deficit

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Vista geral da disposição dos vasos no interior da casa de vegetação. Local: Embrapa Soja, Londrina, PR, Brasil.....30
- Figura 2 – Condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$). (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3. DAS = dias após a semeadura.....35
- Figura 3 – Taxa fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3. DAS = dias após a semeadura.....36
- Figura 4 – Taxa transpiratória ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$). (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3. DAS = dias após a semeadura.....37
- Figura 5 – Temperatura do ar ($^{\circ}\text{C}$) e radiação solar (MJ m^{-2}) no ambiente externo. (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3. DAS = dias após a semeadura.....38
- Figura 6 – Maior turgidez das plantas transgênicas P58 em relação às convencionais BR16, que apresentaram murchamento mais rápido.....44
- Figura 7 – Diferença entre a temperatura do ar ambiente e da folha ($^{\circ}\text{C}$). (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3. DAS = dias após a semeadura.....45
- Figura 8 – Eficiência fotossintética. (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3. DAS = dias após a semeadura.....48
- Figura 9 – Diferença visual da redução do ciclo das plantas BR16 em relação às P58 nos tratamentos sob estresse hídrico (2,5% de UG).....50

Figura 10 – Teor de clorofila (mg cm^{-2}). (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3. DAS = dias após a semeadura.....	51
Figura 11 – Altura de planta (cm). (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3.	53
Figura 12 – Número de nós. (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3.....	53
Figura 13 – Peso seco da parte aérea (g). (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3.....	55
Figura 14 – Número de sementes por planta. (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3....	57
Figura 15 – Número de legumes com semente por planta. (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3.....	57
Figura 16 – Peso fresco da semente (g). (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3.....	58
Figura 17 – Peso seco da semente (g). (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

SAS – Statistical Analysis System

DAS – Dias após a semeadura

LISTA DE SÍMBOLOS

- ψ_w – Potencial hídrico
 G_s – Condutância estomática
 CO_2 – Gás carbônico
 ABA – Ácido abscísico (fitormônio)
 ATP – Adenosina trifosfato
 G_m – Condutância do mesófilo
 NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida (poder redutor)
 Rubisco – Ribulose-1,5-bifosfato-carbo-oxigenase (enzima)
 RuBP – Ribulose-1,5-bifosfato
 H_2O – Água
 C_i – Concentração interna de CO_2 na folha
 qF – *quenching* fotoquímico
 qNF – *quenching* não-fotoquímico
 PSII – Fotossistema II
 ROS – Espécies reativas de oxigênio
 LHC II – Complexo antena do fotossistema II
 F_v – Fluorescência variável
 F_m – Fluorescência máxima
 $F_v:F_m$ – Eficiência fotossintética
 FR – Fotorrespiração
 O_2 – Gás oxigênio
 DREB – *Dehydration Responsive Element Binding protein* (família de genes de fatores de transcrição)
 DRE – *Dehydration Responsive Element* (elemento *cis*-atuante)
 PVC – Poli cloreto de vinila
 UG – Umidade gravimétrica
 GM – Geneticamente modificado

1 INTRODUÇÃO

A soja é uma das culturas agrícolas de maior importância no país, tendo em vista os aspectos de sua cadeia produtiva. Desempenha um papel sócio-econômico ao proporcionar o desenvolvimento de um amplo complexo agroindustrial, gerador de milhares de empregos em diversos setores.

Cultivada em 21,334 milhões de hectares na safra 07/08, e com uma produção de 60,051 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2008), o Brasil é atualmente o primeiro no ranking em termos de exportação de soja e o segundo maior produtor mundial, com a perspectiva de se tornar o primeiro em poucos anos (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2008). Neste cenário internacional, o grande lugar de destaque desta leguminosa deve-se à crescente demanda pelo grão e seus derivados, essencial à produção de alimentos no combate da fome mundial e impulsionada por um novo e potencial mercado, o de combustíveis de origem vegetal, além do desenvolvimento de pesquisas sobre novos usos. Essa tendência para os próximos anos coloca o Brasil como um grande fornecedor de soja para o mundo, com disposição de áreas para a expansão do plantio.

A cultura da soja é afetada por fatores bióticos e abióticos. Perdas causadas por estresses abióticos, como a seca, causam em média mais de 50% das perdas mundiais, enquanto que prejuízos causados por estresses bióticos reduzem em média de 10 a 20% da produtividade das culturas (BRAY, 2004). A ocorrência de adversidades climáticas cada vez mais freqüentes e intensas tem representado um sério problema à produção agrícola. A disponibilidade hídrica, bastante variável em termos espacial e temporal, constitui-se no principal limitante à obtenção de rendimentos mais próximos ao máximo potencial produtivo. Para os produtores, o desafio é então produzir mais com o dado suprimento de água, possivelmente limitado (PASSIOURA, 2007).

No âmbito mundial, a seca se posiciona no primeiro lugar de desastres naturais. Mudanças climáticas, como o aquecimento global decorrente do aumento de “gases de efeito estufa”, têm exposto algumas regiões a condições cada vez mais secas e quentes. A produtividade e expansão agrícola em todo o mundo está dessa

forma cada vez mais sujeita ao aumento da seca, principal fator limitante, devido sua alta magnitude de impacto e ampla distribuição (BARTELS; SUNKAR, 2005; HURA et al., 2007; KALEFETOGLU; EKMEKÇI, 2005; SCHIERMEIER, 2006; STILLER et al., 2008).

Diferentes problemas são criados pela seca conforme a época de ocorrência nas lavouras (PASSIOURA, 2007). Como é difícil prever exatamente quando a planta poderá enfrentar déficits durante seu período de cultivo, principalmente em estádios mais críticos, cultivares com alta tolerância à seca são fortemente desejadas (OYA et al., 2004). As respostas das plantas à seca, ou adaptação, é um elemento-chave para a tolerância ao estresse (TREWAVAS, 2003)

Compreender como as plantas respondem ao déficit hídrico e os mecanismos de tolerância são de importância fundamental para prever os impactos na produção das culturas e constitui-se atualmente em um dos maiores tópicos de pesquisa (ATKIN; MACHEREL, 2008; BARTELS; SUNKAR, 2005). Logo, a fisiologia do estresse em plantas está aumentando sua importância e ganhando atenção em todo o mundo, principalmente devido às mudanças climáticas globais (SHAO et al., 2007).

A busca por plantas tolerantes a seca data muitos anos, principalmente por melhoramento genético clássico, mas o pequeno progresso alcançado foi limitado pela natureza multigênica da característica (BOHNERT; NELSON; JENSEN, 1995; MITTLER, 2006; RONDE, 2004; SHINOZAKI; YAMAGUSHI-SHINOZAKI, 2000). A transgenia apresenta-se como uma interessante opção para a introdução de genes de outras espécies em culturas de interesse comercial, pois se constitui numa técnica relativamente fácil, rápida e barata se comparada ao melhoramento convencional e seleção marcada assistida, métodos que consomem tempo e pesquisa.

A biotecnologia coloca-se hoje com um grande potencial para auxiliar programas de melhoramento no desenvolvimento de soluções de problemas agrônômicos e na agregação de valor às culturas. O uso de técnicas de transformações para introdução de genes e utilização de estratégias moleculares na engenharia genética pode auxiliar e levar a avanços mais simples e efetivos no desenvolvimento de novas variedades de soja com maior tolerância à seca.

Considerando a importância da soja e as limitações causadas pela seca, o trabalho teve como objetivo avaliar as respostas fisiológicas e agronômicas de dois genótipos de soja, um geneticamente modificado contendo a construção *rd29A:DREB1A*, visando maior tolerância à seca, e sua isolínea convencional, comparando-as frente a diferentes condições de disponibilidade hídrica no solo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

A água atua praticamente em todos os processos de uma planta, desempenhando um papel importante na manutenção e distribuição de calor, além de características funcionais de preenchimento, meio de transporte, solvente para reações celulares e processos entre outros (CAMPBELL, 1991; EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2008).

O déficit hídrico pode ser definido como todo o conteúdo de água de um tecido ou célula que está abaixo do conteúdo de água mais alto exibido no estado maior de hidratação (TAIZ; ZEIGER, 2006). A resposta das plantas frente à falta de água é considerada uma síndrome, ou seja, um grupo de respostas simultâneas (LAWLOR, 2002; MITTLER, 2006).

A série de respostas (mudanças) causada pela seca nas plantas é de ordem fisiológica, bioquímica, morfológica e molecular (LEI; TONG; SHENGYAN, 2006; WANG et al., 2001), por alterações em seu metabolismo, crescimento e desenvolvimento (BARTELS; SUNKARS, 2005). Quando a regulação por meios dessas respostas é inadequada, e o metabolismo não se ajusta para a manutenção das funções, danos e eventual morte podem resultar (LAWLOR, 2002).

Em defesa contra déficits hídricos, as plantas podem desenvolver mecanismos tanto para **retardar** como para **tolerar** a desidratação, pela manutenção da hidratação do tecido, e pela capacidade de funcionar enquanto desidratada, respectivamente (TAIZ; ZEIGER, 2006). Mecanismos para retardar a desidratação podem ser resultado da diminuição da perda de água (causados como exemplo pelo fechamento estomático, desenvolvimento de tricomas, redução da área foliar e senescência de folhas velhas para diminuir a transpiração, além de mudanças no tamanho, orientação e enrolamento das folhas para minimizar a superfície exposta à luz, etc) ou maximização da absorção de água (aumento do crescimento radicular e mais profundo). Já os mecanismos de tolerância envolvem o ajustamento osmótico e

eficiência na remoção de espécies reativas de oxigênio, formadas como uma consequência do metabolismo conturbado (BARNABÁS; JAGER; FÉHER, 2008; ISODA; WANG, 2002; LARCHER, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2006).

As respostas das plantas ao déficit hídrico mudam dependendo da espécie e genótipo, do comprimento e intensidade de perda de água, idade e estágio de desenvolvimento, do órgão e do tipo e compartimento celular (BATTAGLIA et al., 2007; BARTELS; SUNKARS, 2005; RAMPINO et al., 2006; ZHU et al., 2005). Tais respostas ocorrem dentro de poucos segundos ou em minutos e horas, dependendo se a ocorrência do déficit é rápida ou gradual (SANTOS; CARLESSO, 1998). Adaptações incluem processos a curto (bioquímico) e longo prazo, como mudanças morfológicas do hábito da planta (BECK et al., 2007; BARTELS; SUNKAR, 2005).

A água é o elemento essencial para manutenção da turgescência da célula (LEVITT, 1980) e com uma perda significativa em seu conteúdo, imediatamente o turgor é perdido e o volume celular começa a diminuir (BARTELS; SUNKARS, 2005; McKERSIE; LESHEM, 1994). O turgor é determinante na expansão celular, e esta, na expansão foliar (TAIZ; ZEIGER, 2006). Um pequeno decréscimo da turgescência causa um decréscimo na taxa de crescimento, evidenciando a grande sensibilidade da expansão foliar a déficits hídricos. A área foliar, importante fator de produção devido a fotossíntese ser proporcional a ela, é reduzida em estresses hídricos não somente pelo tamanho, mas também por menor número de folhas, por diminuir o número e a taxa de crescimento dos ramos (FERNANDÉZ; McINNIS; COTHREN, 1996; TAIZ; ZEIGER, 2006).

O ajuste osmótico, ou acúmulo de solutos pela célula, é o processo pelo qual se reduz o potencial hídrico (ψ_w) da célula, a fim de se manter o equilíbrio hídrico dentro da célula, ou seja, seu volume e turgor (TAIZ; ZEIGER, 2006). Sob condições de seca, vários metabólitos são acumulados e atuam como osmólitos não apenas na manutenção do turgor celular, mas também na destoxicação de espécies reativas de oxigênio e estabilização de proteínas e estruturas da célula (CHINNUSAMY; XIONG, ZHU, 2005; RUIZ-LOZANO, 2003). Entre eles estão açúcares (oligossacarídeos da família da rafinose, sacarose, trehalose e sorbitol), açúcares-álcool (manitol), aminoácidos (prolina), proteínas (chaperonas, LEA, do inglês *late embryogenesis*

abundant) e aminas (glicina betaína e poliaminas) (BARTELS; SUNKAR, 2005; SEKI et al., 2007; TAJI et al., 2002). O ajustamento osmótico tem sido considerado um dos processos cruciais na adaptação das plantas à seca, por sustentar a atividade metabólica no tecido e permitir a retomada do crescimento após o remolhamento, embora esta capacidade varie entre genótipos. Mas, em termos de produtividade em espécies cultivadas, não há muitos estudos de campo mostrando um benefício consistente do ajuste osmótico. Este parece ser crítico mais na sobrevivência do que no aumento do crescimento da planta e de produtividade sob condições de seca (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003; QUARRIE; STOJANOVIC; PEKIC, 1999; SERRAJ; SINCLAIR, 2002).

Estudos recentes têm destacado uma importante proteína durante o estresse hídrico: as aquaporinas, proteínas de membrana. Como durante a seca são necessárias mudanças no fluxo de água para permitir que células e tecidos se adaptem à situação de estresse, as aquaporinas atuam como componentes centrais nas relações hídricas das plantas, pois facilitam a osmose por formar poros específicos à água como uma alternativa à difusão desta pela bicamada lipídica, aumentando assim a permeabilidade da água pela membrana. Esse aumento na permeabilidade da membrana é na ordem de dez a vinte vezes e a regulação da expressão e atividade dessas proteínas são moduladas pela desidratação (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003; KJELLBOM et al., 1999; MAUREL; CHRISPEELS, 2001; SCHAFFNER, 1998; TYERMAN; NIEMIETZ; BRAMLEY, 2002).

Durante a seca a disponibilidade hídrica do solo diminui e o *continuum* solo-planta-atmosfera pode ser perdido (VASELLATI et al., 2001). A planta, portanto, fecha seus estômatos para prevenir perdas de água (STUHFAUTH; SCHEUERMANN, FOCK, 1990; OHASHI et al., 2006). Ao pequeno decréscimo no potencial hídrico da planta então, resulta primeiramente na queda da condutância estomática (G_s), mesmo sob condições hídricas favoráveis, devido à sinalização por parte das raízes para as partes aéreas (LEI; TONG, SHENGYAN, 2006). O fechamento estomático, limitando a difusão de CO_2 de espaços intercelulares para dentro do cloroplasto durante a seca, se dá em resposta ao aumento do fitormônio ácido abscísico (ABA) nessas condições (CORNIC, 2000; LIMA et al., 2002). Essa percepção por parte das raízes do secamento do solo

promove um acúmulo de ABA nesse órgão, que é redistribuído nos tecidos da planta via xilema, agindo como um sinalizador químico para o fechamento dos estômatos e induzindo a expressão de genes relacionados ao estresse (LIU; JENSEN; ANDERSEN, 2005; SEKI et al., 2007). A redução do potencial hídrico das folhas e da turgescência acaba por agir no fechamento estomático. Estudos mostram evidências que combinam ambos os tipos de sinalização, química e hidráulica, atuando juntos ou em tempos diferentes no fechamento dos estômatos (ASAMAA et al., 2002; COMSTOCK, 2002; KALEFETOĞLU; EKMEKÇI, 2005).

As plantas enfrentam o dilema crucial “perder água para fixar carbono”, pois há um conflito entre a conservação da água pela planta e a taxa de assimilação de CO₂ para produção de carboidratos, mediado pela condutância estomática (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003; SANTOS; CARLESSO, 1998). Quando os estômatos estão abertos, absorção de CO₂ é mais limitada do que a perda de água devido a características físicas dos gases. Mas, em condições de baixa disponibilidade hídrica, a diminuição da abertura estomática exerce então maior desvantagem sobre a saída de água (LARCHER, 2000; NOBEL, 2005). Assim, com a redução da condutância estomática, a transpiração declina mais rápido do que a fotossíntese, visto que a perda de água transpirada pelos estômatos depende mais da condutância estomática do que a fotossíntese (LEI; TONG, SHENGYAN, 2006). Dessa forma, para Stiller et al. (2008), a redução da condutância estomática parece ser o caminho mais eficiente de reduzir perdas de água por transpiração.

Para a respiração, a seca tem tipicamente um maior efeito inibitório proporcional na fotossíntese do que na primeira (FLEXAS et al., 2005, 2006; GALMÉS; MEDRANO; FLEXAS, 2006, 2007). O declínio na fotossíntese não é combinado concomitantemente com quedas na respiração (ATKIN; MACHEREL, 2008). Sob estresse hídrico severo, espera-se que ocorra uma redução da demanda de ATP como consequência da redução do crescimento e fotossíntese (FLEXAS; MEDRANO, 2002) e, geralmente, a taxa respiratória cai durante o déficit hídrico devido então à redução da assimilação de fotossintatos e necessidades de crescimento, embora esse comportamento possa depender em parte da espécie (FLEXAS et al., 2005; GHASHGHAIE et al., 2001). Sob estresse hídrico, a taxa respiratória total é pouco

afetada, havendo apenas o aumento da partição de elétrons para a rota alternativa e diminuição da rota do citocromo. (FLEXAS et al. 2006; RIBAS-CARBO et al., 2005).

Durante a fotossíntese, o CO_2 se move da atmosfera ao redor da folha para a cavidade interna sub-estomática pelo estômato, e de lá para o sítio de carboxilação dentro do estroma do cloroplasto através do mesofilo foliar (FLEXAS et al., 2008).

Há muitas controvérsias relativas ao qual é limitação primária da fotossíntese sob seca: fechamento estomático ou prejuízo metabólico (FLEXAS; MEDRANO, 2002; FLEXAS et al., 2006; LAWLOR; CORNIC, 2002). Há um consenso de que a redução da difusão de CO_2 da atmosfera para o local de carboxilação é a causa principal do decréscimo da fotossíntese em várias condições de estresse hídrico (CHAVES; OLIVEIRA, 2004; FLEXAS et al. 2004). Tal redução da capacidade difusiva foliar se dá devido a pelo menos dois componentes que são regulados quase simultaneamente: fechamento estomático (diminuição da condutância estomática) e redução da condutância do mesofilo (G_m). O primeiro é amplamente conhecido de ser a primeira resposta das plantas ao encurtamento de água no solo, mas o segundo foi recentemente reconhecido como uma causa igualmente importante para a redução de difusão de CO_2 sob seca (FLEXAS et al., 2002; ENNAHLI; EARL, 2005), se não mais importante que a condutância estomática (FLEXAS et al., 2008). Segundo Lawlor (2002), a condutância do mesofilo é a capacidade de transporte do CO_2 pela rota combinada (espaços intercelulares → parede celular → membrana plasmática → citossol → envoltório do cloroplasto → estroma), um termo restrito à difusão de CO_2 pelo mesofilo da folha (FLEXAS et al., 2008). De acordo com alguns autores, ambas as condutâncias, estomática e do mesofilo, declinam progressivamente conforme se intensifica o estresse hídrico (GRASSI; MAGNANI, 2005; FLEXAS et al., 2008).

Flexas et al. (2004) afirmam então que o metabolismo não é responsável pelo declínio da fotossíntese em déficits hídricos fracos a moderados, apenas a redução das condutâncias estomática e do mesofilo diminui a difusão do CO_2 , mas não a capacidade bioquímica de assimilar CO_2 . Já em estresses mais severos, ocorre um prejuízo metabólico geral, resultante da combinação de limitação difusiva e bioquímica (FLEXAS et al., 2004; GULÍAS et al., 2002; LAWLOR; CORNIC, 2002; PEÑA-ROJAS et al., 2004).

Pode-se dessa forma dividir as limitações da fotossíntese devido à seca em fatores estomáticos e não-estomáticos (KALEFETOĞLU; EKMEKÇI, 2005; STILLER et al., 2008). O fechamento estomático é geralmente acompanhado do decréscimo da taxa de utilização de ATP e NADPH (substratos da fotossíntese) para a assimilação de CO_2 (HURA et al., 2007). As limitações metabólicas, ou não-estomáticas, incluem mudanças na capacidade da enzima ribulose-1,5-bifosfato-carbo-oxigenase (Rubisco) combinada com a regeneração perturbada da ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) (CENTRITTO; LORETO; CHARTZOULAKIS, 2003; CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003; PARRY et al., 2002). Segundo Flexas et al., (2004) a grande diminuição de RuBP a baixas condutâncias estomáticas pode ser parte do prejuízo geral do metabolismo mais do que resposta específica ao estresse hídrico. Para Lawlor (2002) a regeneração da RuBP limita a fotossíntese mais do que o suprimento de CO_2 ou a atividade da Rubisco. Trabalhos de Flexas e Medrano (2002) mostraram que os conteúdos de RuBP e ATP diminuem cedo no desenvolvimento da seca, a condutâncias estomáticas a partir de $0,15 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$; enquanto a redução da atividade da Rubisco ocorre em valores menores que $0,10 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e a fotoinibição permanente só é ocasionada em valores muito baixos, inferiores a $0,05 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Os autores ainda dividiram o metabolismo fotossintético em cinco sub-processos que implicam em importantes locais de inibição sob seca: (1) capacidade de regeneração da RuBP, (2) síntese de ATP, (3) fotoquímica foliar (indicado pela fluorescência da clorofila), (4) atividade da Rubisco e (5) fotoinibição permanente.

Conforme estômatos fecham no início do estresse, a concentração de CO_2 dentro da folha (C_i) primeiramente declina, mas, se a seca torna-se mais severa, C_i aumenta (OHASHI et al., 2006). Flexas e Medrano (2002) mostraram que redução da C_i confirma a predominância da limitação estomática em restrição à taxa fotossintética na primeira fase da perda de água, sem afetar reações no cloroplasto. Contudo, o aumento do estresse, quando C_i aumenta, indica predominância de limitações não-estomáticas.

Com a restrita disponibilidade de CO_2 devido ao fechamento estomático, e a redução da atividade fotoquímica, pode ocorrer um aumento da suscetibilidade ao dano pela luz (FLEXAS; MEDRANO; 2002; TEZARA; DRISCOLL; LAWLOR, 2008). Quando as clorofilas, pigmentos fotossintéticos, absorvem energia elas alteram suas

configurações passando do estado basal para o estado excitado (nível mais alto de energia). Este estado excitado é muito instável e de vida muito curta. Desta maneira, estes pigmentos, após receberem a energia dos fótons, dissipam esta energia proveniente da luz por diferentes meios (TAIZ; ZEIGER, 2006). O chamado *quenching* fotoquímico (qF) é a dissipação da energia (luminosa) em processos da fotossíntese, usada na formação do poder redutor e ATP, os quais serão utilizados na fase bioquímica do processo fotossintético. Já o *quenching* não-fotoquímico (qNF) é a dissipação de energia em processos outros que não o fotoquímico, sendo o principal processo envolvendo a proteção contra o fotodano. O qNF mede a dissipação térmica (calor) da energia de excitação em excesso, promovido principalmente pela fluorescência da clorofila *a* no fotossistema II (PS II) e pelo ciclo das xantofilas (carotenóides) (COGDELL, 2006; KRAUSE; WEIS, 1991; SAYED, 2003; TAIZ; ZEIGER, 2006), onde a violaxantina é convertida em zeaxantina (LAWLOR, 2002). A temperatura foliar também é positivamente correlacionada com o qNF e negativamente com a taxa de assimilação de CO₂ (ISODA, 2005b).

A limitação da fotossíntese, que reduz o consumo de elétrons liberados da água, causa o excesso de energia de excitação, que se não for eliminado com segurança pode ocasionar danos (LAWLOR, 2002; MULLER; LI; NIYOGI, 2001). Quando a energia armazenada nas clorofilas, ou seja, o estado excitado da clorofila não é rapidamente dissipado pela transferência de excitação ou fotoquímica, ela pode reagir com o oxigênio, formando as chamadas espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), que incluem o singleto (¹O₂), ânions radicais de superóxidos (O₂^{•-}), radicais hidroxilas (OH[•]) e peróxidos de hidrogênio (H₂O₂) (APEL; HIRT, 2004; BARTLES, 2001; CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003; SMIRNOFF; BRYANT, 1999; ASADA, 1999). Estas espécies são as responsáveis por danos fotoxidativos, principalmente em proteínas (D1) do centro de reação do fotossistema II, por destruírem componentes da membrana dos tilacóides, em especial os lipídeos (LAWLOR; CORNIC, 2002). A fotoinibição chega a ocorrer somente em condições de estresse hídrico muito severo e com quase completamente os estômatos fechados (FLEXAS; MEDRANO, 2002).

Quando a taxa de absorção de fótons excede amplamente seu consumo nas reações de carboxilação (LAURIANO et al. 2000), e a planta se protege do efeito danoso da luz dissipando o excesso de energia de excitação sob forma de calor (aumento do qNF), há redução de eficiência do fotossistema II (SOUZA et al., 2004), ligado ao baixo transporte de elétrons pelo fotossistema II e/ou injúrias estruturais do PSII e do complexo antena do fotossintema II (LHCII) (DUBEY, 1997).

A eficiência fotossintética, ou seja, a eficiência do fotossistema II, é calculada pela razão entre a chamada fluorescência variável (F_v) e a máxima (F_m) da clorofila (HAVAUX; ERNEZ; LANNOYE, 1988). Essa relação $F_v:F_m$ expressa o rendimento quântico dos processos fotoquímicos desse fotossintema (LAZÁK, 1999), ou seja, a eficiência relativa da captura de energia luminosa pelo PSII (PEREIRA, 2001). Quando uma planta está com seu aparato fotossintético intacto, a razão $F_v:F_m$ deve variar entre 0,75 e 0,85 (BOLHÁR-NORDENKAMPF et al., 1989), enquanto a queda nesta razão reflete a ocorrência de danos fotoinibitórios nos centros de reação do PSII, como quando as plantas estão sujeitas a seca (BJÖRKMAN; DEMMING, 1987; ÖGREN; ÖQUIST, 1985).

A fotorrespiração (FR) é absorção de O_2 como substrato da enzima Rubisco, em sua atividade oxigenase, com uma liberação concomitante de CO_2 para a atmosfera (TAIZ; ZEIGER, 2006). Devido ao fato de a fotossíntese e a fotorrespiração trabalharem em direções diretamente opostas, a fotorrespiração resulta em perda de CO_2 de células que estejam simultaneamente fixando CO_2 por meio do ciclo de Calvin (OGREN, 1984; LEEGOOG et al., 1995).

Em plantas C_3 como a soja, considerável absorção de O_2 ocorre durante a fotorrespiração (HEBER, 2002). Nessas plantas, a fotorrespiração tem um papel importante como uma rota para o consumo considerável de energia (WINGLER et al., 2000). Por ser um dreno alternativo do fluxo de elétrons induzidos pela luz, a fotorrespiração protege as folhas contra o excesso de redutores e usa energia quando outros métodos de dissipação (como a assimilação de CO_2) são restritos, prevenindo a fotoinibição durante períodos de alta luminosidade e disponibilidade limitada de CO_2 nos cloroplastos (KOZAKI; TAKEBA, 1996; OSMOND et al., 1997; STUHLFAUTH et al., 1990; TAIZ; ZEIGER, 2006). Ainda, a fotorrespiração tem papel fundamental na

geração de metabólitos, como serina e glicina, além da reciclagem de amônia (WINGLER et al., 2000).

A soja se caracteriza por ser bastante sensível a déficits hídricos, quando comparada a outras importantes culturas no mundo, além de seu requerimento hídrico ser relativamente alto, em torno de 800 mm dia⁻¹ para altas produtividades (ISODA, 2005a; De COSTA; SHANMUGATHASAN, 2002; LEI; TONG; SHENGYAN, 2006, EMBRAPA, 2008).

Na cultura da soja, a disponibilidade hídrica é importante em dois períodos de desenvolvimento: germinação-emergência e floração-enchimento de grãos. No primeiro caso prejudica a obtenção de uma boa uniformidade na população de plantas, e no segundo, quando a necessidade atinge o máximo, provoca alterações fisiológicas na planta, como fechamento estomático e enrolamento de folhas. Como consequência, há queda prematura de folhas e flores e abortamento de vagens, resultando por fim em redução de rendimentos de grãos. Na fase vegetativa, a seca reduz crescimento e área foliar, e na reprodutiva, além das reduções mais drásticas no rendimento, um adiantamento na maturação resulta um menor acúmulo de matéria seca, vagens vazias e “chochamento” de grãos (BONATO, 2000; SAITOH; MAHMOOD; KURODA, 1999). No estágio de germinação, o déficit hídrico reduz a produtividade de soja em 20% e no florescimento em 46% (SHOU¹ et al., 1991 apud ZHANG et al., 2007), devido à redução da taxa fotossintética, condutância estomática e da taxa transpiratória da soja (OHASHI et al., 2006; VU et al., 2001).

Segundo Desclaux, Huynh e Roumet (2000), estresses hídricos parecem comandar uma troca precoce do desenvolvimento vegetativo para o reprodutivo, menor número de nós, antecipação da formação de flores e vagens, e um encurtamento da fase reprodutiva acarretando em diminuição do período de enchimento de grãos. De acordo com Brevedan e Egli (2003) o comprimento do período de enchimento de grãos é um importante determinante da produção de todas as plantas graníferas.

Oya et al. (2004) afirmam que a manutenção da alta taxa de crescimento durante períodos de seca parece ser a chave para altas produtividades (tolerância à seca). Em seus trabalhos, para déficit hídrico cedo no desenvolvimento da soja, houve

redução da produção de biomassa vegetal e comprimento de entre-nós; no enchimento de grãos reduziu o número de sementes por legume e após este estágio aumentou o abortamento de legumes e limitou o peso de sementes. Ainda, plantas que sofreram estresses foram mais baixas e houve um menor número de vagens por unidade de matéria seca.

Em vários casos ainda, exposição prolongada de plantas a condições de estresses como a seca resulta no enfraquecimento das defesas da planta e aumento da suscetibilidade a pestes e doenças. (Mittler, 2006).

Plantas têm se adaptado para responder a estresses em níveis moleculares e celulares bem como fisiológicos e bioquímicos (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006). Enquanto adaptações morfológicas e anatômicas podem ser de vital importância para algumas espécies, estas não acontecem em todas as espécies. Em contraste, as respostas celulares para estresse hídrico parecem ser conservadas em todo o reino vegetal (RUIZ-LOZANO, 2003). Em nível molecular, déficits hídricos engatilham várias mudanças na expressão gênica, que pode ser usada para definir as respostas de proteção de uma planta. Muitos esforços estão atualmente direcionados na compreensão de mecanismos de respostas de plantas, em condições na qual a água limita seu crescimento e desenvolvimento, na ordem de identificar produtos de genes que conferem adaptação a déficits hídricos (BRAY, 2004).

Para manter o crescimento e a produtividade, as plantas devem adaptar-se às condições de estresse e exercer mecanismos de tolerância específicos. As modificações das plantas para aumentar a tolerância à seca são mais baseadas na ativação e regulação de genes que protegem e mantêm as funções e componentes da estrutura celular (WANG; VINOCUR; ALTMAN, 2003).

A engenharia genética é uma ferramenta poderosa para melhorar a tolerância das plantas aos diferentes estresses. Recentemente, muitos estudos têm tentado aumentar a tolerância ao estresse por transferência de genes. Os genes selecionados para a transformação são geralmente aqueles que codificam proteínas específicas induzidas por estresses abióticos com funções conhecidas, que incluem proteínas canais de água, enzimas chaves para a biossíntese de osmólitos e destoxificação, além

de proteínas de transporte. Vários genes individuais parecem ter algum impacto positivo na tolerância ao estresse, mas, complexa como é em seca, esta é muito improvável de estar sob controle de um único gene. Uma estratégia mais ampla e promissora pode ser o uso de fatores de transcrição, em especial aqueles em topo de cascata, regulando a expressão de vários genes relacionados ao estresse abiótico (BARTELS; SUNKAR, 2005; CHINNUSAMY; XIONG; ZHU, 2005; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, et al., 2002). Para Beck et al. (2007) também, a super expressão de um fator de transcrição, ou ativador transcripcional de uma seqüência multigênica, cujos produtos direta ou indiretamente conferem aumento na tolerância ao estresse, se mostra a estratégia mais promissora para conter uma síndrome como a seca.

DREB (*Dehydration Responsive Element Binding protein*) é uma família de fatores de transcrição de topo de cascata de eventos moleculares que finalizam com respostas de defesa contra a desidratação celular (LIU et al., 1998; GILMORE et al., 1998; YAMAGUSHI-SHINOZAKI et al., 2002). Estes fatores de transcrição, que reconhecem elementos de resposta à desidratação, têm se mostrado em *Arabidopsis* atuar num papel crucial em promover a expressão de genes de tolerância à seca (PELLEGRINESHI et al., 2004). As proteínas DREB apresentam um domínio conservado de aproximadamente 60 aminoácidos, denominado domínio AP2, que reconhece a região denominada DRE (*Dehydration Responsive Element*), um elemento *cis*-atuante que contém a sequência de bases CCGAC (LIU et al., 1998; SHINOZAKI; YAMAGUSHI-SHINOZAKI, 2000). A região promotora de vários genes envolvidos na resposta à seca também apresentam a região conservada DRE e a ativação e regulação da expressão desses genes são ativadas pelo fator de transcrição DREB (KASUGA, 2004, SEKI, 2001).

Dento da família de genes DREB, foram identificados em *Arabidopsis* dois grupos dos fatores de transcrição que se ligam ao DRE: os genes DREB1 e DREB2, que codificam proteínas estruturalmente diferentes que se ligam ao DRE, mas são induzidas por diferentes estresses. DREB1 é induzido por baixas temperaturas, alta salinidade e déficit hídrico, enquanto DREB2 por estresses osmótico e também hídrico. O elemento promotor DRE parece atuar como um ponto de cruzamento onde diferentes rotas de sinalização engatilhadas por estresse abiótico convergem para integrar

informação e respostas da planta a múltiplos estresses (KASUGA, 1999; KNIGHT; KNIGHT, 2001; LIU et al., 1998; STOCKINGER; GLIMOUR; THOMASHOW, 1997).

Diversos trabalhos relataram que o gene DREB1A super expressado em plantas transgênicas de tabaco, arroz, trigo e *Arabidopsis* resultou numa forte indução na expressão de genes alvos ligados à desidratação, congelamento e salinidade e assim, uma maior tolerância a esses estresses (DUBOUZET et al., 2003; KASUGA et al., 2004; PELLEGRINESHI et al., 2004). Embora o aumento da tolerância, os trabalhos verificaram que este gene, quando dirigido sob um promotor constitutivo, o 35S, provocou retardamento no crescimento das plantas, indicando que a maior tolerância das plantas 35S:DREB1A foi às custas do crescimento e produtividade. Quando DREB1A foi posicionado sob um promotor estresse induzido, o *rd29A*, o efeito de retardo no crescimento das plantas transformadas foi minimizado se comparadas às plantas com o promotor constitutivo (KASUGA et al., 1999, KASUGA et al., 2004; PELLEGRINESHI et al., 2004). Em plantas de amendoim transgênicas, a expressão estresse induzida do *AtDREB1A*, dirigido pelo promotor *rd29A*, não resultou em retardo de crescimento (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2007).

Vários estudos demonstram o importante avanço no uso de fatores de transcrição na aquisição de tolerância aos estresses, o qual pode contribuir para a agricultura e o ambiente, pois plantas transformadas com fatores de transcrição podem super expressar uma gama de genes relacionados com a tolerância ao estresse. Embora possam ocorrer alguns efeitos negativos, como o retardo no crescimento das plantas, estratégias como utilizar promotores estresses-induzidos para controlar a expressão dos fatores de transcrição pode prevenir ou reduzir esses efeitos. A combinação do promotor *rd29A* e do gene DREB1A se mostra então como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de plantas transgênicas tolerantes à seca em diferentes espécies, minimizando os riscos de perdas. Mais avanços e estudos nessa área também podem contribuir com o aperfeiçoamento dessa estratégia (PELLEGRINESHI et al., 2004; KASUGA et al., 2004).

2.2 Material e métodos

2.2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Três experimentos subseqüentes foram conduzidos em casa de vegetação com cobertura de vidro na Embrapa Soja, Londrina, PR, Brasil (23°11'37" S, 51°11'03"W, 630m alt). Duas cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merr.], com hábito de crescimento determinado, sendo uma convencional, BR16, e sua isolínea transgênica, denominada P58, contendo a construção *rd29A:DREB1A*, foram inoculadas com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (Nitragin Cell Tech, líquido) e semeadas em 25/01, 07/04 e 07/08 do ano de 2006.

Para a transformação da cultivar transgênica P58, o cassete *rd29A:DREB1A*, contendo o promotor estresse induzido *rd29A* e a região codante DREB1A, ambos elementos de *Arabidopsis thaliana*, foram introduzidos por biobalística em plantas de soja conforme Beneventi (2006), com o objetivo de aumentar a tolerância ao déficit hídrico. Neste trabalho, a autora confirmou a expressão do gene *AtDREB1A* por PCR em tempo real em condições de déficit hídrico, pela indução do promotor *rd29A* em um evento positivo e a estabilidade da integração no genoma de soja na primeira geração proveniente deste evento.

Foram usados vasos de PVC com capacidade de seis litros de substrato, formado por areia seca em solução nutritiva, esta suplementada semanalmente, e o uso de estacas como suporte para as plantas. Na Figura 1 é apresentada uma visão geral da área experimental, destacando a disposição dos vasos no interior da casa de vegetação. Termohigrógrafos foram utilizados para monitorar a umidade relativa do ar e a temperatura do ar, que variou dentro da faixa de 23 e 35 °C com o auxílio de ventiladores e aquecedores instalados na casa de vegetação. Houve o controle parcial do fotoperíodo, feito este com suplementação utilizando luz artificial durante vinte dias após a germinação, entre as três e oito horas e meia da manhã. Quando necessário, o tratamento fitossanitário foi feito segundo recomendações técnicas (EMBRAPA, 2008).

Durante todo período de condução dos experimentos, foram monitorados, em estações meteorológicas automáticas instaladas próximas à casa de vegetação onde

foram conduzidos os experimentos, os valores de radiação solar e temperatura do ar, no ambiente externo.

Figura 1 – Vista geral da disposição dos vasos no interior da casa de vegetação. Local: Embrapa Soja, Londrina, PR, Brasil

2.2.2 Tratamentos e desenho experimental

Após a germinação, as plantas foram mantidas a uma condição de umidade gravimétrica do solo (UG) de 15%. A partir do florescimento, R1/R2 segundo a escala de desenvolvimento proposta por Fehr e Caviness (1977), as plantas foram submetidas a duas disponibilidades hídricas: UG de 15% (controle) e de 2,5%, tratamento com estresse hídrico. O déficit hídrico foi iniciado com 5% UG, sendo reduzido

gradativamente a 2,5% de UG e mantido a este nível até o final dos experimentos. Anteriormente foi feita uma calibragem (curva) de capacidade de armazenamento de água no substrato, a partir da qual se definiu os valores de 15% de UG como a umidade correspondente ao valor de adequado de suprimento de água às plantas (próximo à capacidade de campo), e 5% de UG para a aplicação de restrição hídrica às plantas. A redução da disponibilidade hídrica de 5% para 2,5% de UG nos tratamentos sob estresse foi para a obtenção de níveis mais severos de deficiência hídrica.

Os diferentes níveis de disponibilidade de água foram mantidos através de pesagens manuais diárias, excluindo os pesos das plantas através de vasos reservas com os mesmos tratamentos. Para a melhor uniformidade entre os tratamentos, isopor picado em pequenos cubos foi colocado na superfície dos vasos para reduzir a perda de água do substrato por evaporação.

Os ensaios foram instalados sob o delineamento de blocos ao acaso com os tratamentos em arranjo fatorial (2x2): duas cultivares (P58 e BR16) vs dois níveis de disponibilidade hídrica (2,5 e 15% de umidade gravimétrica do solo), com três amostras (vasos) por parcela dentro de cada bloco e quatro blocos, totalizando 48 parcelas. Cada parcela foi constituída de uma planta por vaso e o rodízio dos vasos dentro dos blocos feito semanalmente.

O modelo matemático do desenho experimental utilizado para esta pesquisa foi o que segue, eq. (1):

$$Y_{ijkl} = m + Cult_i + Bloco_j + Umid_k + Cult * Umid_{ik} + \varepsilon_{ijkl} \quad (1)$$

em que,

Y_{ijkl} é o efeito da variável resposta da cultivar i , no bloco j , no nível de umidade k ;

m é o efeito da média geral do experimento;

$Cult_i$ é o efeito do cultivar i ;

$Bloco_j$ é o efeito do bloco j ;

$Umid_k$ é o efeito do nível de umidade k ;

$Cult * Umid_{ik}$ é o efeito da interação entre a cultivar i e nível de umidade k ;

ε_{ijkl} é o efeito do resíduo aleatório com $N \cong (0, \sigma^2)$.

2.2.3 Medições

Avaliações fisiológicas: com o uso de um medidor de trocas gasosas com sistema aberto de fluxo de ar (Li-6400; Li-COR), foram medidos condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), taxa fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e transpiratória ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração interna de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$), temperaturas do ar ambiente e foliar ($^{\circ}\text{C}$), e sua diferença. A densidade de fluxo de fótons fotossintéticos utilizada dentro da câmara foi de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A eficiência fotossintética (F_v/F_m) foi medida com um fluorômetro (Plant Efficiency Analyser; Hansatech) e o teor de clorofila (mg cm^{-2}) com um medidor portátil (SPAD-502; Minolta). As medições foram feitas em datas distintas após o florescimento pleno (R2), em uma área de dois cm^2 do folíolo mediano do terceiro trifólio, completamente expandido, no período compreendido entre as nove e onze horas e meia da manhã.

O acompanhamento do *status* hídrico das plantas foi mediante os valores de condutância estomática, que segundo Flexas et al. (2004), para propósitos comparativos em estudos com fotossíntese, a condutância estomática é o indicador mais sensível à severidade do estresse hídrico em folhas. Foram utilizados intervalos de condutância estomática definidos pelos autores nesse estudo como base para o acompanhamento do déficit hídrico nas plantas, onde: i) controle: $G_s \geq 0,2 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$; ii) estresse moderado: $G_s = 0,1$ a $0,2 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$; iii) estresse severo: $G_s \leq 0,1 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Avaliações agronômicas: consistiram de dados fenológicos, altura de planta (cm), número de nós, comprimento médio dos entre-nós (cm), peso seco da parte aérea

(g), número de sementes por planta, pesos fresco e seco de semente (g) e número de legumes com semente.

2.2.4 Análise estatística

A partir dos dados obtidos foram avaliadas todas as pressuposições da Análise de Variância (ANOVA) (COCHRAN; COX, 1957) e aplicado o teste de comparações múltiplas de médias pelo método de Tukey ($p \leq 0,05$).

Anteriormente ao método da ANOVA, foram realizadas todas as análises exploratórias para as variáveis medidas, verificando as pressuposições de normalidade dos resíduos (SHAPIRO; WILK, 1965), homogeneidade das variâncias dos tratamentos (BURR; FOSTER, 1972), aditividade do modelo (TUKEY, 1949) e análise dos resíduos (PARENTE, 1984).

Os dados obtidos foram analisados através do pacote estatístico SAS - Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE, 2001) versão 8.2.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Avaliações fisiológicas

A partir dos resultados observados nas variáveis mensuradas verificaram-se dois comportamentos bem distintos, basicamente em função dos níveis de umidade do solo: 15% e 2,5% de UG. A maioria das diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$) das análises dos dados realizadas foi para esta causa de variação.

Numa análise geral, envolvendo as três épocas de cultivo, observou-se que as plantas sob maior disponibilidade hídrica (UG de 15%) apresentaram as maiores médias para condutância estomática, taxa fotossintética e transpiratória, praticamente ao longo de todo o período avaliado (Figuras 2, 3 e 4). Verificou-se, ainda nessa mesma umidade, que os valores para estas mesmas variáveis foram maiores nas plantas P58,

transformadas com a construção *rd29A:DREB1A*, do que nas plantas da cultivar convencional (BR16), em quase todas as avaliações.

Observou-se também uma tendência de declínio dos valores com o avanço do ciclo, mais pronunciado no primeiro e último cultivo, em todos os tratamentos (Figuras 2, 3 e 4). Mesmo para as plantas sob 15% de UG, consideradas controle, foi observado tal declínio das respostas ao longo dos experimentos. Esse comportamento, talvez, seja devido à disponibilidade de água, considerada inicialmente adequada, não ter sido realmente suficiente para atender à demanda hídrica das plantas, principalmente das convencionais, fazendo com que estas sentissem mais com o passar dos dias e o conseqüente aumento da massa transpirante. Tal declínio, ainda, pode ter sido agravado devido às condições climáticas (temperatura do ar e radiação solar), as quais possivelmente provocaram ou contribuíram para o aumento da demanda hídrica das plantas (Figura 5).

Da mesma forma, em todos os cultivos, as plantas do tratamento com déficit hídrico, 2,5% de UG, também apresentaram declínio nas respostas, porém mais acentuado e alcançando valores bem mais inferiores (Figuras 2, 3 e 4). Para as duas disponibilidades hídricas, quando não foram iguais estatisticamente, as médias das plantas P58 foram sempre superiores às das convencionais BR16, indicando que a possível expressão do gene *DREB1A* introduzido nas plantas tenha contribuído para as melhores respostas, para as duas condições de disponibilidade hídrica.

Sendo a temperatura do ar e radiação solar diferentes para os meses do ano em que os experimentos foram conduzidos (Figura 5), as respostas das plantas não seguiram sempre um mesmo padrão, embora o primeiro e último experimento tenham sido mais semelhantes. A tendência de declínio das respostas das plantas para condutância estomática, taxa fotossintética e transpiratória, em ambas as disponibilidades hídricas, foi diferente, quando não interrompidas por picos, os quais foram bem visíveis nos resultados do segundo cultivo (Figuras 2, 3 e 4). A faixa de valores das variáveis também foi diferente, provavelmente, devido às condições climáticas.

Figura 2 – Condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$). (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3. DAS = dias após a semeadura

Figura 3 – Taxa fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). **(a)** cultivo 1; **(b)** cultivo 2; **(c)** cultivo 3. DAS = dias após a semeadura

Figura 4 – Taxa transpiratória ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$). (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3. DAS = dias após a semeadura

Figura 5 – Temperatura do ar ($^{\circ}\text{C}$) e radiação solar (MJ m^{-2}) no ambiente externo. (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3. DAS = dias após a semeadura

Durante o primeiro cultivo (janeiro a março) as condições climáticas foram mais favoráveis ao cultivo da soja, no que se refere à quantidade de radiação solar, com reflexos nas condições fotoperiódicas e térmicas. Com as médias de radiação solar e temperatura do ar mais altas (Figura 5a), o declínio das respostas das plantas sob 15% de UG nas três variáveis mensuradas (Figuras 2a, 3a e 4a) deve ter ocorrido devido a maior demanda hídrica da atmosfera e, portanto, a quantidade de água disponível, talvez, não tenha sido suficiente para suprir as necessidades das plantas, como já comentado. Sendo o promotor *rd29A*, presente no cassete introduzido nas plantas GM, do tipo estresse induzido (expressado apenas em condições de estresse), a diferença entre as plantas transgênicas e convencionais, para a UG de 15%, pode ser devido à expressão do gene sob tais condições, possivelmente estressantes, descritas. Polizel (2007), que avaliou a expressão gênica destas mesmas cultivares P58, verificou ainda uma expressão basal do gene nos tratamentos, inclusive nos controles de 15% de UG e, também, durante a fase vegetativa, anterior ao início do déficit hídrico.

Nos dois níveis de umidade no solo, essa diferença entre as cultivares foi crescente conforme se alcançavam os estádios mais avançados de desenvolvimento, sendo bastante evidenciados nas três últimas análises (Figuras 2a, 3a e 4a). O efeito aditivo resultante do período sob restrição hídrica, mesmo para a UG de 15%, e a maior proximidade da senescência das folhas, possam talvez explicar tal fato.

Observou-se ainda, um detalhe interessante na última avaliação da taxa fotossintética. As plantas P58, inclusive as sob 2,5% de UG, mantiveram-se acima das plantas BR16 a 15% de UG (Figura 3a) e, mesmo para a condutância estomática e taxa transpiratória, se igualaram estatisticamente, enquanto sua isolínea convencional BR16 sob 2,5% de UG se posicionou bem mais abaixo (Figuras 2a e 4a).

No segundo cultivo não houve uma separação bem distinta entre os comportamentos resultantes das diferentes umidades, 2,5 e 15% de UG. As respostas das plantas também não seguiram um padrão decrescente contínuo como nos demais cultivos (Figuras 2b, 3b e 4b). Verificou-se um grande pico nas respostas das plantas durante as avaliações intermediárias, provavelmente, devido às condições climáticas nesse período. Desde o período inicial até o intermediário de desenvolvimento das plantas (em torno dos 80 DAS), os valores médios de temperatura do ar e de radiação

solar foram inferiores aos demais cultivos (Figura 5b), os quais reduziram a demanda evaporativa da atmosfera e, conseqüentemente, propiciaram melhores condições para a manutenção da condição hídrica das plantas em níveis mais adequados para o seu metabolismo, independente da disponibilidade de água no solo. Durante este período, as taxas fotossintéticas e transpiratória e a condutância estomática mantiveram-se em níveis maiores do que aqueles observados durante o mesmo período no outros dois cultivos (Figuras 2b, 3b e 4b). Verificou-se pelos valores da condutância estomática que nesse período as plantas, com exceção das BR16 a 2,5% de UG, podem não ter sofrido estresse hídrico por não alcançarem o limiar de $0,2 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-1} \text{ s}^{-1}$, abaixo do qual é considerado estresse moderado, segundo Flexas et al. (2004).

Com o aumento da temperatura do ar e da radiação solar a partir dos 83 DAS (Figura 5b), as plantas reagiram e a condutância estomática e as taxas fotossintética e transpiratória das plantas apresentaram incremento considerável (Figuras 2b, 3b e 4b). Para Larcher (2000), picos na fotossíntese podem ocorrer devido a possíveis combinações e interações de fatores externos. Valores até mesmo pouco mais elevados para as taxas fotossintética e transpiratória foram verificados na avaliação aos 91 DAS. A partir desta avaliação, sem condições extremas ou grandes alterações nas médias de radiação e temperatura, todas estas variáveis voltaram a cair, visto a continuidade da restrição hídrica e amadurecimento das plantas.

Na última avaliação, aos 105 DAS, todas as plantas BR16 sob 2,5% de UG já haviam morrido (Figuras 2b, 3b e 4b). Esse encurtamento de ciclo, frente às plantas sob 15% de UG e mesmo à P58 sob o mesmo tratamento de umidade, é uma resposta bastante característica à falta de água (DESCLAUX, HUYNH; ROUMET, 2000), mais significativo em plantas com maior sensibilidade ao déficit hídrico. Essa aceleração do desenvolvimento e adiantamento da senescência reflete a tentativa da planta em completar seu ciclo mais rapidamente para evitar a desidratação, e garantir a perpetuação da espécie (LARCHER, 2000). Como conseqüência, as plantas apresentam, geralmente, menor rendimento, devido a um menor período de enchimento de grãos, componente chave da produtividade total e perdas em outros índices relacionados aos componentes de produtividade (BARNABÁS et al., 2008). Yang e Zhang (2006) e Plaut et al. (2004) também afirmam que déficit hídrico durante o período

de enchimento de grãos, além de reduzir a fotossíntese, antecipa a senescência e encurta o período de enchimento de grãos.

Já as plantas P58 sob 2,5% de UG permaneceram vivas até após a última avaliação, embora com ciclo inferior em relação ao grupo de plantas de 15% de UG, em torno de 15 dias a menos que a média de 123 dias observados para esta UG. Na avaliação aos 105 DAS, esse tratamento apresentou um aumento na condutância estomática e taxa transpiratória devido possivelmente ao aumento de radiação (Figuras 2b, 4b e 5b). Ao final do ciclo, para estas variáveis, os valores observados nas plantas como um todo, a 15% e 2,5% de UG, também se aproximaram, inclusive para a taxa fotossintética (Figura 3b), similar ao ocorrido no primeiro cultivo.

Já no terceiro cultivo, para as mesmas três variáveis consideradas, as plantas sob 15% de UG apresentaram desempenho semelhante aos demais cultivos: declínio das respostas gradualmente com o transcorrer do déficit hídrico e valores superiores das plantas P58, quando não iguais estatisticamente (Figuras 2c, 3c e 4c) (dados já discutidos).

O grupo das plantas a 2,5% de UG atingiu valores bastante reduzidos bem mais cedo, aos 58 DAS, com a condutância estomática abaixo de $0,05 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a taxa transpiratória abaixo de $2 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e taxa fotossintética inferior a $6 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. No primeiro cultivo essas faixas de valores foram atingidas pelas plantas sob 2,5% de UG apenas a partir dos 69 DAS, enquanto no segundo cultivo não foi observado esse fato (Figuras 2, 3 e 4). Aos 58 DAS, se considerou que estas plantas já estavam sofrendo estresse hídrico severo, visto os valores de condutância estomática abaixo do limiar de $0,1 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (FLEXAS et al., 2004), e a partir desta data as plantas não se recuperaram mais (Figura 2c). As plantas sentiram o estresse mais cedo neste cultivo devido talvez alguma resposta à maior radiação solar e, consequentemente, maior demanda evaporativa da atmosfera.

Segundo Flexas et al. (2006), sob condições de estresse hídrico, durante o primeiro estágio, quando a condutância se situa acima de $0,05 - 0,10 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a fotossíntese é limitada principalmente pela restrição da difusão do CO_2 (redução da condutância estomática e condutância do mesófilo); durante o segundo estágio, sob estresse hídrico severo, quando a condutância cai abaixo desse limiar, há um prejuízo

foto e bioquímico, e a fotossíntese é limitada indiretamente pelo estresse oxidativo (ação de espécies reativas de oxigênio), e não uma resposta direta à falta de água. De acordo com os autores ainda, essas mudanças são precedidas pelo aumento da atividade anti-oxidante na folha, quando a condutância se situa na faixa de $0,15 - 0,20 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Aos 58 DAS, as plantas sob UG de 2,5% já apresentavam condutância estomática abaixo do limiar de $0,05 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e mantiveram esses valores até o final do ciclo (Figura 2c). Tendo ocorrido o prejuízo descrito, não houve a possibilidade de recuperação da fotossíntese, que se manteve abaixo de $6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Figura 3c). O mesmo ocorreu no primeiro cultivo, a partir dos 69 DAS, quando a condutância estomática caiu abaixo, ou mesmo próxima, do limiar citado, e a fotossíntese também se manteve abaixo do mesmo valor de $6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ desde então (Figuras 2a e 3a).

Após terem alcançado o limiar de $0,05 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para a condutância estomática, a partir dos 58 DAS do terceiro cultivo, não houve diferença estatística entre as cultivares sob déficit hídrico, 2,5% de UG, nas variáveis discutidas (Figuras 2c, 3c e 4c).

Em nenhum dos cultivos a condutância estomática das plantas a 15% de UG atingiu o limiar de $0,05 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, logo, não sofreram estresse hídrico severo (Figura 2). No entanto, ao alcançarem valores de $0,20 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, como no segundo e terceiro cultivo, e mesmo de $0,10 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no primeiro, já indicam terem sofrido algum estresse pela falta de água, ou mesmo apresentado alguma resposta de defesa contra o déficit hídrico.

As respostas de condutância estomática, taxa fotossintética e transpiratória, quando comparadas conjuntamente dentro de cada cultivo individual, apresentaram um mesmo padrão (Figuras 2, 3 e 4). Isso se deve ao fato desses processos estarem intimamente ligados. Os valores de condutância estomática sofreram uma grande queda já a partir da segunda avaliação no primeiro e terceiro cultivo (Figuras 2a e 2c). Sendo a condutância estomática o primeiro evento fisiológico afetado em resposta ao declínio da disponibilidade hídrica (LEI; TONG; SHENGYAN, 2006), a queda para as outras duas variáveis se deu de forma paralela, embora mais adiante (Figuras 3a, 3c,

4a e 4c), devido à redução na abertura dos estômatos limitar a entrada de CO₂ para dentro dos cloroplastos e a saída de água para a atmosfera (FLEXAS et al., 2004). Segundo Lawlor (2002), a seca faz com que a condutância estomática e a fotossíntese caiam, aproximadamente em paralelo, embora em secas mais severas, a condutância estomática atinge o mínimo e a fotossíntese continua a cair. Outro fator a se considerar, é o aparelho utilizado para medir essas variáveis se basear nas mesmas diferenças gasosas, de CO₂ e H₂O, entre a amostra na câmara com a folha e a referência, para calcular os valores de condutância estomática, taxa fotossintética e transpiratória.

A introdução do cassete nas plantas P58 provocou uma ou mais alterações ainda não identificadas, responsável pelas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) das respostas. A provável expressão do cassete, promovendo uma esperada super-expressão do fator de transcrição DREB1A, ativador de diversos genes de defesa da planta contra estresses abióticos, dentre estes o hídrico, permitiu uma melhor performance das plantas P58, na maioria das avaliações em relação às suas isolíneas convencionais BR16, nas duas condições de disponibilidade hídrica. A alteração provocada foi tão significativa e positiva, no que tange a busca por maior tolerância à seca das plantas, que as plantas transgênicas P58 sob déficit hídrico chegaram, em alguns casos, a se igualar às plantas sob 15% de UG, e mesmo a ultrapassar as BR16 dessa umidade em algumas situações.

Durante os cultivos, para as duas condições de umidade gravimétrica, a maior condutância estomática das plantas P58, permitiu uma taxa transpiratória destas geralmente maior em relação às convencionais (Figuras 2 e 4). Esta maior condutância estomática das plantas transgênicas pode ser explicada pela maior manutenção do turgor celular (TAIZ; ZEIGER, 2006), garantida talvez pela expressão de genes relacionados ao ajuste osmótico e ativados pelo fator de transcrição DREB1A (POLIZEL, 2007). Na Figura 6 se verifica a maior turgidez das plantas P58 em relação às BR16, sob déficit hídrico, sendo visualmente notável o murchamento mais rápido das plantas convencionais. As maiores taxas transpiratórias das plantas transgênicas P58 refletiram em menores temperaturas foliares, representadas pelas maiores diferenças de temperaturas entre o ar e folha (Figura 7). O processo de transpiração é de extrema importância para as plantas perderem calor e manterem-se em níveis térmicos ótimos

para o bom funcionamento e regulação do metabolismo, visto que processos como fotossíntese e respiração dependem do bom funcionamento de enzimas, diretamente influenciadas pela temperatura (TAIZ; ZEIGER, 2006). Quando a água não é limitante, a abertura dos estômatos permite uma maior transpiração das plantas devido ao seu bom *status* hídrico, refletindo na manutenção da temperatura foliar abaixo da do ar ambiente circundante.

Figura 6 – Maior turgidez das plantas transgênicas P58 em relação às convencionais BR16, que apresentaram murchamento mais rápido

Em todos os cultivos, para o grupo das plantas sob 15% de UG, os valores de diferença de temperatura (entre o ar e a folha) foram sempre positivos (Figura 7). A partir dos valores das condutâncias estomáticas destas plantas (Figura 2), quase sempre acima do limiar de $0,20 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, considerado como controle para Flexas et al. (2004), também indicou o melhor *status* hídrico destas em relação aos tratamentos sob déficit hídrico.

Figura 7 – Diferença entre a temperatura do ar ambiente e da folha (°C). (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3. DAS = dias após a semeadura

Já para as plantas sob 2,5% de UG, os valores negativos, ou seja, temperaturas foliares acima das do ar ambiente (Figura 7), demonstraram o estresse hídrico sofrido pelas plantas, consequente da limitada disponibilidade hídrica que afetou a transpiração das plantas, não permitindo assim o resfriamento das mesmas. Os menores valores de condutâncias estomáticas, abaixo de $0,20 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, também confirmaram o déficit hídrico sentido pelas plantas (Figura 2).

De acordo com Isoda (2005b), há uma correlação positiva entre taxa transpiratória, condutância estomática e taxa de assimilação de CO_2 para soja. Durante déficits hídricos, a redução da condutância estomática limitando a perda de água por transpiração resulta na maior temperatura foliar. Valores elevados de temperatura na folha causam também diminuição na taxa de assimilação de CO_2 por danos fotoinibitórios ao aparato fotossintético (LI; KANG; ZHANG, 2004). A temperatura foliar então se correlaciona negativamente com a taxa de assimilação de CO_2 e positivamente com o qNF (ISODA, 2005a).

No primeiro e terceiro experimento, as maiores radiações solares e temperaturas médias do ar durante o período de cultivo fizeram com que as plantas sentissem mais rápido a falta de água, visto a ocorrência de diferenças de temperaturas negativas a partir dos 69 e 58 DAS, respectivamente (Figuras 5a, 5c, 6a e 6c). Já no segundo cultivo, com radiação solar e temperaturas médias do ar inferiores, a diferença se manteve positiva na maioria das avaliações. Somente nas três avaliações finais houve a queda para valores negativos, decorrente do incremento da radiação solar e efeito prolongado da restrição de água (Figuras 5b e 6b).

O efeito da radiação solar sobre as plantas pode ter sido potencializado pela seca, visto que a redução na condutância estomática limita a perda de calor pela transpiração, interação bastante comum durante déficits hídricos (TEZARA; DRISCOLL; LAWLOR, 2008). O efeito detrimento causado pela interação entre os estresses hídrico e térmico é muito maior se comparado àqueles decorrentes de cada estresse aplicado separadamente (MITTLER, 2006; RIZHSKY; LIANG; MITTLER, 2002). Ainda, o estresse térmico pode ser um perigo potencial em casa de vegetação, onde a baixa velocidade do ar e alta umidade reduzem ainda mais a taxa de resfriamento foliar (TAIZ; ZEIGER, 2006).

De acordo com Larcher (2000), o comportamento da fotossíntese durante a seca é em função do balanço hídrico das plantas, e sendo este negativo, os estômatos permanecem cada vez mais fechados. Segundo Cornic (2000), o fechamento estomático é considerado uma das causas da diminuição da fotossíntese, pois diminui a disponibilidade de CO₂ no mesófilo. Dessa forma, as maiores condutâncias estomáticas (menor resistência estomatal) das plantas P58 também proporcionaram uma maior difusão de CO₂ para dentro do mesófilo da folha, permitindo assim maiores taxas fotossintéticas, dentro de cada disponibilidade hídrica, durante os cultivos (Figuras 2 e 3).

As médias de eficiência fotossintética de todos os tratamentos, em todos os cultivos, foram bastante próximas, e as diferenças em grande parte não significativas ($p \leq 0,05$) até as avaliações intermediárias (Figura 8). A diferença entre as médias foi crescente conforme o avanço da restrição hídrica, sendo bastante evidenciado nas três últimas análises. Os valores para os tratamentos se mantiveram geralmente entre 0,7 e 0,8, caindo na maioria das vezes abaixo desta faixa apenas nas avaliações finais. Segundo autores, valores abaixo de 0,75 refletem a ocorrência de danos fotoinibitórios, sendo causados pela seca (BJÖRKMAN; DEMMING, 1987; BOLHÁR-NORDENKAMPF et al., 1989; ÖGREN; ÖQUIST, 1985). O efeito aditivo resultante do período sob condições de déficit hídrico e a maior proximidade da senescência das folhas (amarelecimento) devem ter sido responsáveis pelas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na eficiência fotossintética observada ao final nos diferentes tratamentos.

Em seus estudos, Stiller et al. (2008) também constataram que a eficiência fotossintética em folhas de batata submetidas à seca foi completamente inalterada até as avaliações intermediárias. Além de distúrbios no processo enzimático da fotossíntese (HURA et al., 2007), um dos fatores metabólicos limitando a fotossíntese durante a seca, é a inibição fotoquímica, por danos ao aparato fotossintético, especialmente ao fotossistema II (TAIZ; ZEIGER, 2006), e de processos de transporte de elétrons (STILLER et al., 2008; GIARDI et al., 1996). Mas diversos autores afirmam que o déficit hídrico, até certos níveis de severidade, não diminui substancialmente a atividade do fotossistema II (CENTRITTO, 2005; CORNIC; BRIANTAIS, 1991; FLEXAS; MEDRANO, 2002; GIARDI et al., 1996; HAVAUX, 1992; LAWLOR, 2002, LAWLOR;

Figura 8 – Eficiência fotossintética. (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3. DAS = dias após a semeadura

CORNIC, 2002; LU; ZHANG, 1998; RAMANJULU et al., 1998; SHANGGUAN; SHAO; DYCKMANS, 2000; STILLER et al., 2008). Em seus trabalhos com soja, Ohashi et al. (2006) também verificaram que a eficiência do fotossistema II não foi alterada pelo déficit hídrico. Ainda, autores consideram que sob déficit hídrico o transporte de elétrons continua a uma taxa significativa mesmo em tecidos severamente estressados (HEBER, 2002; KITAO et al. 2003; TEZARA et al.; 2008). Sob déficit hídrico, a fotorrespiração em folhas de plantas C_3 estressadas pode manter o transporte de elétrons similar àqueles observados em folhas não estressadas enquanto a taxa de assimilação de CO_2 diminui (FLEXAS et al., 1998, 2002; NOCTOR et al., 2002; ORT e BAKER, 2002; STUHLFAUTH, SCHEUERMANN; FOCK, 1990). Dessa forma, a queda tardia na eficiência fotossintética dos tratamentos (Figura 8) se deu somente quando a seca atingiu um ponto mais avançado, cujo nível coincide com danos ao aparato fotossintético, ou seja, uma limitação metabólica que ocorre em condições severas de estresse (FLEXAS et al., 2004, 2006; GRASSI; MAGNANI, 2005).

Dentro dos níveis de 2,5% de UG, para a eficiência fotossintética, as plantas P58 se sobressaíram em relação às BR16 nos três cultivos (Figura 8). Chama a atenção o interessante fato das plantas transgênicas apresentarem maior eficiência fotossintética do que as plantas convencionais nas últimas avaliações dos dois primeiros experimentos (Figura 8a e 8b). Em tais avaliações, observou-se ainda que as plantas P58 sob 15% de UG apresentaram menor eficiência fotossintética do que as plantas P58 a 2,5% de UG.

As plantas BR16 a 2,5% de UG, que mais sentiram a restrição hídrica, visualmente encurtaram o ciclo em relação às demais (Figura 9), razão provável pela a qual apresentaram as menores médias de eficiência fotossintética nas avaliações finais (Figura 8), devido estarem mais próximas da senescência.

Figura 9 – Diferença visual da redução do ciclo das plantas BR16 em relação às P58 nos tratamentos sob estresse hídrico (2,5% de UG)

O teor de clorofila das plantas a 15% de UG foi geralmente maior devido este pigmento ser reduzido sob condições de seca (Medrano et al., 2002). Dentro dessa umidade, as plantas BR16 apresentaram geralmente maiores valores ao longo do ciclo, e apenas nas avaliações finais dos cultivos que os valores desta decaíram mais do que os das plantas P58 (Figura 10). Sob 2,5% de UG, as respostas das plantas foram semelhantes, os maiores valores em geral para as BR16 e apenas nas avaliações finais para as P58, embora as pequenas diferenças entre as cultivares e, na maioria das avaliações, iguais estatisticamente. Não foi possível verificar um padrão nas respostas de teores de clorofila entre os tratamentos, principalmente no terceiro cultivo, somente que as diferenças foram mais significativas nas avaliações finais. A partir das respostas, verificou-se apenas o acúmulo de clorofila com o desenvolvimento das plantas e a posterior redução, talvez adiantada pelo efeito do déficit hídrico e com a senescência das plantas, tendência normal no desenvolvimento das plantas em geral.

Figura 10 – Teor de clorofila (mg cm^{-2}). (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3. DAS = dias após a semeadura

A concentração interna de CO₂ medida nas plantas apresentou grande variabilidade em todos os cultivos, devido talvez ser uma variável muito sensível à regulação do aparelho utilizado, que resultou em dados muitos inconsistentes, principalmente nas plantas mais debilitadas pelo estresse hídrico e próximas da senescência (dados não apresentados).

2.3.2 Avaliações agronômicas

O início do florescimento das plantas, estágio R1 segundo a escala de desenvolvimento proposta por Fehr e Caviness (1977), se deu aos 31, 51 e 32 DAS, respectivamente nos três cultivos, devido às diferentes condições climáticas nos períodos de condução de cada experimento.

As plantas BR16 apresentaram sempre as maiores alturas em relação às P58, independente dos níveis de umidade gravimétrica (Figura 11). Entretanto, não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os níveis de umidade gravimétrica, para uma mesma cultivar, nos dois primeiros cultivos (Figuras 9a e 9b). Apenas no terceiro cultivo, para as duas cultivares, BR16 e P58, as médias de altura de plantas sob 15% de UG foram superiores às das plantas sob 2,5% de UG, devido às melhores condições hídricas, provavelmente (Figura 11c). As maiores alturas das plantas da cultivar BR16 foram devido, principalmente, aos maiores comprimentos de entre-nós observados nessa cultivar, provocado inclusive por um maior estiolamento do que nas P58, fenômeno bastante comum em cultivos em casa de vegetação.

A diferença de altura entre as duas cultivares era visível mesmo desde os estádios vegetativos, quando ainda não havia iniciado o déficit hídrico, e as plantas eram todas mantidas a uma UG de 15%. Segundo alguns melhoristas, o melhoramento genético para aumentar a tolerância à seca tende a provocar redução de porte das plantas. A expressão basal do gene *AtDREB1A*, confirmada por Polizel (2007) durante o primeiro cultivo, ativando outros genes de defesa contra estresses abióticos, pode também ter sido um dreno de energia no metabolismo da planta, afetando seu crescimento. Kasuga et al. (2004) relataram que a super expressão do mesmo gene *AtDREB1A*, embora dirigido pelo promotor constitutivo 35S, também afetou o

Figura 11 – Altura de planta (cm). (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3

Figura 12 – Número de nós. (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3

crescimento em plantas transgênicas de tabaco e *Arabidopsis* em condições não estressantes. No mesmo trabalho ainda, plantas transformadas com o promotor *rd29A* também apresentaram expressão do gene DREB1A com condições normais de disponibilidade de água, embora a essa expressão tenha sido menor se comparadas às plantas transformadas com o 35S. Segundo Beck et al. (2007), a adaptação a um estressor pode também levar a um decréscimo em outros processos como fotossíntese e crescimento. Mais estudos e avanços são necessários para contribuir com o aperfeiçoamento dessa tecnologia.

Para número de nós, no primeiro cultivo não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos (Figura 12a), e no segundo cultivo, a diferença em torno de um a dois nós, pode ser considerada normal e comum no cultivo da soja (Figura 12b). Para o segundo cultivo ainda, o encurtamento de ciclo das plantas sob 2,5% de UG acarretou num menor período de desenvolvimento e, por conseguinte, um menor número de nós destas em relação às plantas a 15% de UG. Apenas no terceiro cultivo a diferença entre os dois níveis de umidade foi pronunciada, com maior número de nós sob 15% de UG (Figura 12c), devido ao provável efeito do estresse hídrico nas plantas a 2,5% de UG.

O maior peso seco da parte área foi observado nas plantas sob 15% de UG, e entre estas, nas plantas BR16 (Figura 13). O peso seco da planta, de forma geral, está mais relacionado ao número de nós do que à altura da planta, devido aos trifólios brotarem das gemas localizadas nos nós do caule. Sendo o número de nós praticamente iguais entre os tratamentos, o maior peso seco das plantas sob 15% de UG foi em função provavelmente da maior área foliar. De acordo com Taiz e Zeiger (2006) a área foliar é importante porque em geral a fotossíntese (assimilação de carbono) é proporcional a ela, e a menor área foliar é uma tentativa da planta se assegurar viva durante a seca, embora resulte numa menor taxa de crescimento (SINCLAIR; PURCELL, 2005).

Figura 13 – Peso seco da parte aérea (g). (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3

As plantas sob 15% de UG também apresentaram os maiores número de sementes por planta e número de legumes com semente (Figuras 14 e 15). Uma das consequências do déficit hídrico durante o período da fase reprodutiva, mais especificamente no desenvolvimento dos legumes e início do enchimento de grãos, é o abortamento das vagens e o não enchimento dos grãos, ocasionando as chamadas “vagens chochas” (BONATO, 2000), ou seja, legumes vazios sem grãos cheios, o qual explica os menores valores observados para as plantas sob restrição hídrica (2,5% de UG).

A ocorrência de deficiências hídricas durante o florescimento acarreta num forte abortamento de flores (BONATO, 2000). Depois de restabelecido o suprimento de água, a reidratação pode promover um considerável enchimento dos grãos remanescentes, que ao final do ciclo podem apresentar maiores peso de grãos (DESCLAUX; HUYNH; ROUMET, 2000). Períodos de limitação de água, bem como de alta temperatura, durante o desenvolvimento dos grãos causam grandes perdas de produtividade (BARNABÁS; JAGER; FEHER, 2008). Como nos experimentos não houve reidratação, e a restrição de água foi contínua até a morte das plantas, as plantas sob 2,5% de UG apresentaram peso de grãos bastante inferior aos das plantas sob 15% de UG (Figuras 16 e 17), estas com maior disponibilidade de água para encher os grãos. Para a UG de 15% ainda, as plantas BR16 obtiveram os maiores pesos de grãos em relação às P58. Sendo a BR16 um cultivar comercial, esta já foi melhorada geneticamente para a produtividade. A expressão do gene *AtDREB1A* nas plantas transgênicas, ainda em fase de desenvolvimento, pode ter causado outras alterações ainda não identificadas que podem ter tido algum efeito sobre a produção, talvez como um dreno de energia, embora as diferenças entre ambas as cultivares tenham sido pequenas. Segundo Mittler (2006), a resistência a um ou à combinação de estresses pode estar geneticamente ligado à supressão de crescimento ou produtividade nas plantas.

Figura 14 – Número de sementes por planta. (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3

Figura 15 – Número de legumes com semente por planta. (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3

Figura 16 – Peso fresco da semente (g). (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3

Figura 17 – Peso seco da semente (g). (a) cultivo 1; (b) cultivo 2; (c) cultivo 3

Em suma, as melhores respostas das plantas transgênicas podem estar relacionadas à maior expressão de outros genes de defesa contra dessecação, ativados pelo fator de transcrição DREB1A. Todavia, outras possíveis alterações provocadas nas plantas, como no porte e rendimento, ainda não foram bem caracterizadas. Dessa forma, mais estudos são necessários no sentido de melhoria dessas características, além da identificação de outros possíveis efeitos ocasionados. Também são necessários estudos complementares a campo para verificar o enraizamento mais profundo do sistema radicular na busca de maior captação de água, esta limitada pela capacidade do vaso, o comportamento das plantas frente a condições normais de cultivo, como temperatura e umidade relativa do ar, velocidade do vento, entre outros. Essa maior caracterização fisiológica e agrônômica permitirá, posteriormente, que essas plantas possam ser inseridas em programas de melhoramento genéticos específicos, ou na transformação de diferentes cultivares garantindo assim uma maior tolerância à seca, manutenção da produtividade, e por fim, da lucratividade, em ambientes sujeitos à seca.

2.3.3 Modelo matemático

O efeito de vasos foi inicialmente incluído no modelo do delineamento experimental, mas devido à ausência de significância deste efeito isolado e interações com as demais causas de variação, os graus de liberdade referentes a tais efeitos foram adicionados à variância residual (ANEXO A).

3 CONCLUSÃO

A expressão da construção com o gene DREB1A confere, provavelmente, maior tolerância das plantas de soja geneticamente modificadas em condições de restrição hídrica, baseada em respostas fisiológicas. Mas, o efeito da melhor performance fisiológica das plantas transgênicas sobre o desempenho agrônomo da cultura (produtividade) deve ser ainda comprovado em condições de campo (de lavoura).

REFERÊNCIAS

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 601-639, 1999.

ASAMAA, K.; SOBER, A.; HARTUNG, W.; NIINEMETS, U. Rate of stomatal opening, shoot hydraulic conductance and photosynthetic characteristics in relation to leaf abscisic acid concentration in six temperate deciduous trees. **Tree Physiology**, Victoria, v. 22, p. 267-276, 2002.

ATKIN, O.K.; MACHEREL, D. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. **Annals of Botany**, Oxford, p. 1-19, 2008. (Review)

BARNABÁS, B.; JAGER, K.; FEHÉR, A. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 31, p. 11-38, 2008.

BARTELS, D. Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance? **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, p. 284-286, 2001.

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

BATTAGLIA, M.; SOLORZANO, R.M.; HERNANDEZ, M.; CUELLAR-ORTIZ, S.; GARCIA-GOMEZ, B.; MARQUEZ, J.; COVARRUBIAS, A.A. Proline-rich cell wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to water deficit in common bean seed-lings. **Planta**, Berlin, v. 225, p. 1121-1133, 2007.

BECK, E.H.; FETTIG, S.; KNAKE, C.; HARTING, K.; BHATTARAI, T. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 32, n. 3, p. 501-510, 2007.

BENEVENTI, M.A. **Transformação genética em soja pela inserção da construção gênica contendo a região promotora do gene *rd29A* e a região codante do gene *DREB1A* de *Arabidopsis thaliana*, visando tolerância à seca**. 2006. 126 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

BHATNAGAR-MATHUR, P.; DEVI, M.J.; REDDY, D.S.; LAVANYA, M.; VADEZ, V.; SERRAJ, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHARMA, K.K. Stress-inducible expression of *AtDREB1A* in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) increases transpiration efficiency under water-limiting conditions. **Plant Cell Reports**, New York, v. 26, p. 2071-2082, 2007.

BJÖRKMAN, O.; DEMMING, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, Berlin, v. 170, p. 489-504, 1987.

BOHNERT, H.J.; NELSON, D.E.; JENSEN, R.G. Adaptations to environmental stresses. **Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 1099-1111, 1995.

BOLHÁR-NORDENKAMPF, H.R.; LONG, S.P.; BAKER, N.R.; OEQUIST, G.; SCHREIBER, U.; LECHNER, E.G. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: A review of current instrumentation. **Functional Ecology**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 497-514, 1989.

BONATO, E.R. **Estresses em soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 254 p.

BRAY, E. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 407, Nov. 2004.

BREVEDAN, R.E.; EGLI, D.B. Short periods of water stress during seed filling, leaf senescence, and yield of soybean. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 2083-2088, 2003.

BURR, I.W.; FOSTER, L.A. **A test for equality of variances**. West Lafayette: University of Purdue, 1972. 26p.

CAMPBELL, M.K. **Biochemistry**. Fort Worth, USA: Harcourt Brace Jovanovich College Publishers, 1991. 622 p.

CENTRITTO, M. Photosynthetic limitations and carbon partitioning in cherry in response to water deficit and elevated [CO₂]. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 106, n. 2/3, p. 233-242, Apr. 2005.

CENTRITTO, M.; LORETO, F.; CHARTZOULAKIS, K. The use of low [CO₂] to estimate diffusional and non-diffusional limitations to photosynthetic capacity of salt stress olive samplings. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 26, p. 585-594, 2003.

CHAVES, M.M.; MAROCO, J.P.; PEREIRA, J.S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 30, p. 239-264, 2003.

CHAVES, M.M.; OLIVEIRA, M.M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 407, p. 2365-2384, Nov. 2004.

CHINNUSAMY, V.; XIONG, L.; ZHU, J.K. Use of genetic engineering and molecular biology approaches for crop improvements. In: ASRAF, M.; HARRIS, P.J.C. (Ed).

Abiotic Stresses: plant resistance through breeding and molecular approaches. New York: Food Products Press, 2005. chap. 2, p. 47-95.

COCHRAN, W.G.; COX, G. **Experimental Designs**. 2nd ed. New York: John Wiley, 1957. 611 p.

COGDELL, R.J. The structural basis of non-photochemical quenching is revealed? **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 11, n. 2, Feb. 2006.

COMSTOCK, J.P. Hydraulic and chemical signaling in the control of stomatal conductance and transpiration. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 195-200, 2002.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira:** grãos: décimo segundo levantamento, setembro 2008. Brasília: Conab, 2008. Disponível em <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 12 out. 2008.

CORNIC, G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, p. 187-188, 2000.

CORNIC, G.; BRIANTAIS, J.M. Partitioning of photosynthetic electron flow between CO₂ and O₂ in a C₃ leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO₂ concentrations and during drought stress. **Planta**, Berlin, v. 183, p. 178-184, 1991.

De COSTA, W.A.J.M.; SHANMUGATHASAN, K.N. Physiology of yield determination of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under different irrigation regimes in the sub-humid zone of Sri-Lanka. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 75, p. 23-35, 2002.

DESCLAUX, D.; HUYNH, T.T.; ROUMET, P. Identification of soybean plant characteristics that indicate the timing of drought stress. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 716-722, 2000.

DUBEY, R.S. Photosynthesis in plants under stressful conditions. In: MOHAMMAD, P. (Ed.) **Handbook of photosynthesis**. Tuscon, Arizona: University of Arizona, New York, 1997.

DUBOUZET, J.G.; SAKUMA, Y.; ITO, Y.; KASUGA, M.; DUBOUZET, E.D.; MIURA, S.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought, high-salt and cold-responsive gene expression. **Plant Journal**, Oxford, v. 33, p. 751-763, 2003.

EMBRAPA. **Tecnologias de Produções de Soja - Região Central do Brasil 2008.**

Londrina: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados; Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. 208 p. (Embrapa Soja, Sistema de Produções, 12).

ENNAHLI, S.; EARL, H.J. Physiological limitations to photosynthetic carbon assimilation in cotton under water stress. **Crop Science**, Madison, v. 45, p. 2374-2382, 2005.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development.** Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1977. 11p. (Special Report, 80).

FERNÁNDEZ, C.J.; McINNES, K.J.; COTHREN, J.T. Water status and leaf area production in water-and-nitrogen-stressed cotton. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 1224-1233, 1996.

FLEXAS, J.; ESCALONA, J.M.; MEDRANO, H. Down-regulation of photosynthesis by drought under field conditions in grapevine leaves. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 25, p. 893-900, 1998.

FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Drought-inhibition of photosynthesis in C_3 plants: stomatal e non-stomatal limitations revisited. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, p. 183-189, 2002.

FLEXAS, J.; GALMÉS, J.; RIBAS-CARBÓ, M.; MEDRANO, H. The effects of water stress on plant respiration. In: LAMBERS, H.; RIBAS-CARBÓ, M. (Ed.). **Plant Respiration: from cell to ecosystem.** Dordrecht, the Netherlands: Springer, 2005. chap. 6, p. 85-94.

FLEXAS, J.; BOTA, J.; ESCALONA, J.M.; SAMPOL, B.; MEDRANO, H. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 29, 461-471, 2002.

FLEXAS, J.; BOTA, J.; LORETO, F.; CORNIC, G.; SHARKEY, D. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C_3 plants. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 6, p. 269-279, 2004.

FLEXAS, J.; BOTA, J.; GALMÉS, J.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBÓ, M. Keeping a positive balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, n. 127, p. 343-352, 2006.

FLEXAS, J.; RIBAS-CARBÓ, M.; DIAZ-ESPEJO, A.; GALMÉS, J.; MEDRANO, H. Mesophyll conductance to CO_2 : current knowledge and future prospects. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 31, p. 602-621, 2008.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2008:** anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2008. p.502.

GALMÉS, J.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Acclimation of rubisco specificity factor to drought in tobacco: discrepancies between *in vitro* and *in vivo* estimations. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 3659-3667, 2006.

GALMÉS, J.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Photosynthetic limitation in response to water stress and recovery in Mediterranean plant with different growth forms. **New Phytologist**, London, v. 175, p. 81-93, 2007.

GHASHGHAIE, J.; DURANCEAU, M.; BADECK, F.W.; CORNIC, G.; ADELINE, M-T.; DELEENS, E. $\delta^{13}\text{C}$ of CO_2 respired in the dark in relation to $\delta^{13}\text{C}$ of leaf metabolites: comparison between *Nicotiana sylvestris* and *Helianthus annuus* under drought. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, p. 505-515, 2001.

GIARDI, M.T.; CONA, A.; GIEKEN, B.; KUCRA, T.; MASOJÍDEK, T.; MATTOO, A.K. Long-term drought stress induces structural and functional reorganization of photosystem II. **Planta**, Berlin, v. 199, p. 118-125, 1996.

GILMORE, S.J.; ZARKA, D.G.; STOCKINGER, E.J.; SALAZAR, M.P.; HOUGHTON, J.M.; THOMASHOW, M.F. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. **Plant Journal**, Oxford, v. 16, p. 433-442, 1998.

GRASSI, G.; MAGNANI, F. Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, p. 834-849, 2005.

GULÍAS, J.; FLEXAS, J.; ABADÍA, A.; MEDRANO, H. Photosynthetic responses to water deficit in six Mediterranean sclerophyll species: possible factors explaining the declining distribution of an endemic Balearic species (*Rhamnus ludovici-salvatoris*). **Tree Physiology**, Victoria, v. 22, p. 687-698, 2002.

HAVAUX, M. Stress tolerance of photosystem II *in vivo*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, p. 424-432, 1992.

HAVAUX, M.; ERNEZ, M.; LANNOYE, R. Correlation between heat tolerance and drought tolerance in cereals demonstrated by rapid chlorophyll fluorescence tests. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 133, p. 555-560, 1988.

HEBER, U. Irrungen, Wirrungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C_3 plants. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 73, p. 223-231, 2002.

HURA, T.; HURA, K.; GRZESIAK, M.; RZEPKA, A. Effect of long-term drought stress on leaf gas exchange and fluorescence parameters in C_3 and C_4 plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 29, p. 103-113, 2007.

ISODA, A. Adaptive responses of soybean and cotton to water stress I. Transpiration changes in relation to stomatal area and stomatal conductance. **Plant Production Science**, Tokyo, v. 8, p. 16-26, 2005a.

ISODA, A. Adaptive responses of soybean and cotton to water stress II. Changes in CO₂ assimilation rate, chlorophyll fluorescence and photochemical reflectance index in relation to leaf temperature. **Plant Production Science**, Tokyo, v. 8, p. 131-138, 2005b.

ISODA, A.; WANG, P. Leaf temperature and transpiration of field-grown cotton and soybean under arid and humid conditions. **Plant Production Science**, Tokyo, v. 5, p. 224-228, 2002.

KALEFETOĞLU, T.; EKMEKÇİ, Y. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. **G. U. Journal of Science**, Ankara, v. 18. n. 4, p. 723-740, 2005.

KASUGA, M.; MIURA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29a* promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 45, n. 3, p. 346-350, 2004.

KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, p. 287-291, mar. 1999.

KITAO, M.; LEI, T.T.; KOIKE, T.; TOBITA, H.; MARUYAMA, Y. Higher electron transport rate observed at low intercellular CO₂ concentration in long-term drought-acclimated leaves of Japanese mountain birch (*Betula ermanii*). **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 118, p. 406-413, 2003.

KJELLBOM, P.; LARSSON, C.; JOHANSSON, I.; KARLSSON, M.; JOHANSON, U. Aquaporins and water homeostasis in plants. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 25, p. 308-314, 1999.

KNIGHT, H.; KNIGHT, M. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, p. 262-267, 2001.

KOZAKI, A.; TAKEBA, G. Photorespiration protects C₃ plants from photophosphorylation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 53, p. 474-479, 1996.

KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 313-350, 1991.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. Tradução de C.H.B.A. Prado. São Carlos: RiMa Artes e Textos, 2000. 531 p.

LAURIANO, J.A.; LIDON, F.C.; CARVALHO, C.A.; CAMPOS, P.S.; MAOS, M.C. Drought effects on membrane lipids and photosynthetic activity in different peanut cultivars. **Photosynthetica**, Praha, v. 38, p. 7-12, 2000.

LAWLOR, D.W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, p. 871-885, 2002.

LAWLOR, D.W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficit in higher plants. **Plant, Cell and Environment**. Oxford, v. 25, p. 275-294, 2002.

LÁZAK, D. Chlorophyll *a* fluorescence induction. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1412, p. 1-28, 1999.

LEEGOOD, R.C.; LEA, P.J.; ADCOCK, M.D.; HAEUSLER, R.D. The regulation and control of photorespiration. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, n. 46, p. 1397-1414, 1995.

LEI, W.; TONG, Z.; SHENGYAN, D. Effect of drought and rewatering on photosynthetic physioecological characteristics of soybean. **Acta Ecologica Sinica**, Amsterdam, v. 26, n. 7, p. 2073-2178, 2006.

LEVITT, J. **Responses of plants to environmental stresses**. New York: Academic Press, 1980. 497 p.

LI, F.; KANG, S.; ZHANG, J. Interactive effects of elevated CO₂, nitrogen and drought on leaf area, stomatal conductance, and evapotranspiration of wheat. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v. 67, p. 221-233, 2004.

LIMA, A.L.S.; DaMATTA, F.M.; PINHEIRO, H.A.; TOTOLA, M.R.; LOUREIRO, M.E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 47, p. 239-247, 2002.

LIU, F.; JENSEN, C.R.; ANDERSEN, M.N. A review of drought adaptation in crop plants: changes in vegetative and reproductive physiology induced by ABA-based chemical signals. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 56, p. 1245-1252, 2005.

LIU, Q.; KASUGA, M.; ABE, Y.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p. 1391-1406, 1998.

LU, C.; ZHANG, J. Effects of water stress on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition in wheat plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 25, p. 883-892, 1998.

MAUREL, C.; CHRISPEELS, M.J. Aquaporins: a molecular entry into plant water relations. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 135-138, 2001.

McKERSIE, B.D.; LESHEM, Y. **Stress and stress coping in cultivated plants**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1994.

MEDRANO, H.; ESCALONA, J.M.; BOTA, J.; GULÍAS, J.; FLEXAS, J. Regulation of photosynthesis of C_3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, p. 895-905, 2002.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 11, n. 1, p. 15-19, Jan. 2006.

MULLER, P.; LI, X-P.; NIYOGI, K.K. Non-photochemical quenching: a response to excess light energy. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 1558-1566, 2001.

NOBEL, P.S. **Physicochemical and Environmental Plant Physiology**. 3rd ed. New York: Academic Press, 2005. 567 p.

NOCTOR, G.; VELJOVIC-JOVANOVIC, S.; DRISCOLL, S.; NOVITSKAYA, L.; FOYER, C.H. Drought and oxidative load in the leaves of C_3 plants: a predominant role for photorespiration? **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, p. 841-850, 2002.

ÖGREN, E.; ÖQUIST, G. Effects of drought on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition susceptibility in intact willow leaves. **Planta**, Berlin, v. 166, n. 3, p. 380-388, Nov. 1985.

OGREN, W.L. Photorespiration: pathways, regulation, and modification. **Annual Reviews of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 35, p. 415-442, 1984.

OHASHI, Y.; NAKAYAMA, H.; SANEOKA, H.; FUJITA, K. Effects of drought stress on photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and stem diameter of soybean plants. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 50, p. 138-141, 2006.

ORT, D.R.; BAKER, N.R. A photoprotective role for O_2 as an alternative electron sink in photosynthesis? **Current Opinion in Plant Biology**, Stuttgart, v. 5, p. 193-198, 2002.

OSMOND, B.; BADGER, M.R.; MAXWELL, K.; BJÖRKMAN, O.; LEEGOOD, R. Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. **Trends in Plant Science Research News**, Kidlington, v. 2, p. 199-121, 1997.

OYA, T.; NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J.R.B.; TOBITA, S.; ITO, O. Drought tolerance characteristics of Brazilian soybean cultivars – Evaluation and characterization of drought tolerance of various Brazilian soybean cultivars in the field. **Plant Production Science**, Tokyo, v. 7, p. 129-137, 2004.

PARENTE, R.C.P. **Aspectos da análise de resíduos**. 1984. 118 p. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agronômica) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1984.

PARRY, M.A.J.; ANDRALOJC, P.J.; KHAN, S.; LEA, P.J.; KEYS, A. J. Rubisco Activity: effects of drought stress. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, p. 833-839, 2002.

PASSIOURA, J. The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 2, p. 113-117, 2007.

PELLEGRINESCHI, A.; REYNOLDS, M.; PACHECO, M.; BRITO, R.M.; ALMERAYA, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; HOISINGTON, D. Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. **Genome**, Ottawa, v. 47, p. 493-500, 2004.

PEÑA-ROJAS, K.; ARANDA, X.; FLECK, I. Stomatal limitation to CO₂ assimilation and down-regulation of photosynthesis in *Quercus ilex* reprints in response to slowly imposed drought. **Tree Physiology**, Victoria, v. 24, p. 813-822, 2004.

PEREIRA, W.E. **Trocas gasosas, fluorescência da clorofila, crescimento e composição mineral de quatro porta-enxertos de citros submetidos a estresse por alumínio, em cultivo hidropônico**. 2001. 123p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

PLAUT, Z.; BUTOW, B.J.; BLUMENTHAL, C.S.; WRIGLEY, C.W. Transport of dry matter into developing wheat kernels and its contribution to grain yield under post-anthesis water deficit and elevated temperature. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 86, p. 185-198, 2004.

POLIZEL, A.M. **Avaliações moleculares, morfo-anatômicas e fisiológicas de soja geneticamente modificada com a construção *rd29A:DREB1A* de *Arabidopsis thaliana*, visando tolerância à seca**. 2007. 125 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

QUARRIE, S.A.; STOJANOVIC, J.; PEKIC, S. Improving drought resistance in small-grained cereals: a case study, progress and prospects. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 29, p. 1-21, 1999.

RAMANJULU, S.; SREENIVASALU, N.; GIRIDHARA KUMAR, S.; SUDHAKAR, C. Photosynthetic characteristics in mulberry during water stress and rewatering. **Photosynthetica**, Praha, v. 35, p. 259-263, 1998.

RAMPINO, P.; PATALEO, S.; GERERDI, C.; MITA, G.; PERROTTA, C. Drought response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, p. 2143-2152, 2006.

RIBAS-CARBO, M.; TAYLOR, N.L.; GILES, L.; BUSQUETS, S.; FINNEGAN, P.M.; DAY, D.A.; LAMBERS, H.; MEDRANO, H.; BERRY, A.; FLEXAS, J. Effects of water stress on respiration in soybean leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 139, p. 466-473, 2005.

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; MITTLER, R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in Tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 1143-1151, Nov. 2002.

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

RUIZ-LOZANO, J.M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress: new perspectives for molecular studies. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 13, p. 309-317, 2003.

SAITOH, K.; MAHMOOD, T.; KURODA, T. Effect of moisture stress at different growth stages on flowering and pod set in determinate and indeterminate soybean cultivars. **Japan Journal of Crop Science**, Madison, v. 68, p. 537-544, 1999.

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

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistics: version 8.2. 6th.ed. Cary, 2001.

SAYED, O.H. Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. **Photosynthetica**, Praha, v. 41, p. 321-330, 2003.

SCHAFFNER, A.R.; Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations? **Planta**, Berlin, v. 25, p. 131-139, 1998.

SCHIERMEIER, Q. The cost of global warming. **Nature**, London, v. 439, p. 374-375, 2006.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ABE, H.; KASUGA, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stress by using a full-length cDNA microarray. **Plant Cell**, Baltimore, v. 13, p. 61-72, 2001.

SEKI, M.; UMEZAWA, T.; URANO, K.; SHINOZAKI, K. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, Stuttgart, v. 10, p. 296-302, 2007.

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

SHANGGUAN, Z.; SHAO, M.; DYCKMANS, J. Effects of nitrogen nutrition and water deficit on net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in winter wheat. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 156, p. 46-51, 2000.

SHAO, H.; JIANG, S.; LI, F.; CHU, L.; ZHAO, C.; SHAO, M.; ZHAO, X.; LI, F. Some advances in plant stress physiology and their implications in the systems biology era. **Biointerfaces**, Amsterdam, v. 54, p. 33-36, 2007.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika**, Cambridge, v. 52, p. 591-611, 1965.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUSHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, Stuttgart, v. 3, p. 217-223, 2000.

SINCLAIR, T.R.; PURCELL, L.C. Is a physiological perspective relevant in “genocentric” age? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 2777-2782, Nov. 2005.

SMIRNOFF, N.; BRYANT, J.A. DREB takes the stress out of growing up. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, p. 229-230. 1999.

SOUZA, R.P.; MACHADO, E. C.; SILVA, J.A.B.; LAGO, A.M.M.A.; SILVEIRA, J.A.G. Photosynthesis gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 45-56, 2004.

STILLER, I.; DULAI, S.; KONDRÁK, M.; TARNAI, R.; SZABÓ, L.; TOLDI, O.; BÁNFALVI, Z. Effects of drought on water content and photosynthetic parameters in potato plants expressing the trehalose-6-phosphate synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **Planta**, Berlin, v. 227, p. 299-308, 2008.

STOCKINGER, E.J.; GILMOUR, S.J.; THOMASHOW, M.F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 94, p. 1035-1040, 1997.

STUHFATH, T.; SCHEUERMANN, R.; FOCK, H.P. Light energy dissipation under water stress conditions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 92, p. 1053-1061, 1990.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Massachusetts: Publishers Sunderland, 2006. 705 p.

TAJI, T.; OHSUMI, C.; IUCHI, S.; SEKI, M.; KASUGA, M.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Importance roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, Oxford, v. 29, p. 417-426, 2002.

TEZARA, W.; DRISCOLL, S.; LAWLOR, D.W. Partitioning of photosynthetic electron flow between CO₂ assimilation and O₂ reduction in sunflower plants under water deficit. **Photosynthetica**, Praha, v. 46, n. 1, p. 127-134, 2008.

TREWAVAS, A. Aspects of plant intelligence. **Annals of Botany**, Oxford, v. 92, p. 1-20, 2003.

TUKEY, J.W. One degree of freedom for non-additivity. **Biometrics**, Washington, v. 5, p. 232-242, 1949.

TYERMAN, S.D.; NIEMIETZ, C.M.; BRAMLEY, H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 25, p. 173-194, 2002.

VASELLATI, V.; OESTERHELD, D.; MEDAN, D.; LORETI, J. Effects of flooding and drought on the anatomy of *Paspalum dilatatum*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 88, p. 355-360, 2001.

VU, J.C.V.; DESCH, R.W.; PENNANEN, A.H. ALLEN JUNIOR, L.H.; BOOTE, K.J. BOWES, G. Soybean photosynthesis, rubisco, and carbohydrate enzymes function at supraoptimal temperatures in elevated CO₂. **Plant Physiology**, Rockville, v. 158, p. 295-307, 2001.

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 560, p. 285-292, 2001.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, Berlin, v. 218, p. 1-14, 2003.

WINGLER, A.; LEA, P.J.; QUICK, W.P.; LEEGOOG, R.C. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, v. 355, p. 1517-1529, 2000.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; KASUGA, M.; LIU, Q.; NAKASHIMA, K.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; SHIWARI, Z.K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K. Biological mechanisms of drought stress response. **JIRCAS Working Report**, Tsukuba, v. 23, p. 1-8, 2002.

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

YANG, J.C.; ZHANG, J.H. Grain filling of cereals under soil drying. **New Phytologist**, London, v. 169, p. 223-236, 2006.

ZHANG, M.; DUAN, L.; TIAN, X.; HE, Z.; LI, J. WANG, B.; LI, Z. Uniconazole,-induced tolerance of soybean to water deficit n relation to changes in photosynthesis, hormones and antioxidant system. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, p. 709-717, 2007.

ZHU, X.; GONG, H.; CHEN, G.; WANG, S.; ZHANG, C. Different solute levels in two spring wheat cultivars induced by progressivefield water stressat different developmental stages. **Journal of Arid Environments**, London, v. 62, p. 1-14, 2005.

ANEXOS

ANEXO A – Esquema da ANOVA.

Causa de variação (cv)	Graus de liberdade (gl)
Blocos	3
Cultivar	1
Umidade	1
Cultivar * Umidade	1
Resíduo	41
Total	47