



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CIBELLE ENGELS

**“OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS DE SOJA
GENETICAMENTE MODIFICADAS COM O GENE
ATDREB2A VISANDO TOLERÂNCIA À SECA”**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA



INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ



EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA
AGROPECUÁRIA

CIBELLE ENGELS

**“OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS DE
SOJA GENETICAMENTE MODIFICADAS COM O GENE
ATDREB2A VISANDO TOLERÂNCIA À SECA”**

Londrina
2010

CIBELLE ENGELS

**“OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS DE SOJA
GENETICAMENTE MODIFICADAS COM O GENE
ATDREB2A VISANDO TOLERÂNCIA À SECA”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Alexandre Lima Nepomuceno
Coorientador: Dra. Renata Fuganti

Londrina
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

E570 Engels, Cibelle
Obtenção e caracterização de plantas de soja geneticamente modificadas com o gene *AtDREB2A* visando tolerância à seca /Cibelle Engels. – Londrina, 2010.
110 f. : il.

Orientador: Alexandre Lima Nepomuceno.
Dissertação (Mestrado em Genética e biologia molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e biologia molecular, 2010.

1.Tolerancia– Teses. 2 *AtDREB2A*,.– Teses. 3. Cascata gênica– Déficit hídrico – Teses. 4. *Gycine max* (L. Merrill) – Teses. I. Nepomuceno, Alexandre Lima. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título

CDU 631.52:633.34

CIBELLE ENGELS

**“OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS DE SOJA
GENETICAMENTE MODIFICADAS COM O GENE *ATDREB2A*
VISANDO TOLERÂNCIA À SECA”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof° Dr. Alexandre Lima Nepomuceno
EMBRAPA – Soja – UEL

Dr. Hugo Bruno Correa Molinari
EMBRAPA - Agroenergia

Prof° Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira
IAPAR – UEL

Londrina, 18 de fevereiro de 2010.

À Deus que me conhecia antes mesmo de nascer escolheu meus pais e minha família de uma forma especial, me deu a capacidade e talentos de permanecer na pesquisa, me amou, me aperfeiçoou e nunca desistiu de mim.

Ofereço

Aos meus pais que são exemplos de pais e de pessoas, que me ensinaram a não desistir diante dos problemas, e sim lutar por aquilo que desejamos. A quem quero honrar, amar e respeitar.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu Pai e meu amado;

Aos meus pais que me incentivaram em todos os momentos e plantaram em meu coração a vontade de estudar;

À minha irmã Izabelle que em todos os momentos e de tantas maneiras me mostrou o que é amar e como é uma verdadeira relação de amizade. Obrigada por todas as vezes que se doou por mim, pelos seus ouvidos, pelas suas conversas e por ser essa pessoa autoritária a quem tanto amo;

À minha irmã Michele que com a sua calma característica me ensinou tantas coisas, principalmente através das conversas de biólogas e por conselhos profissionais;

Ao meu namorado Ademir, que nos momentos críticos me fez olhar e me impediu de desistir da pesquisa, pelo amor e carinho nos momentos mais difíceis, por ficar horas e horas me ajudando nas coisas que eu achava que eram impossíveis de serem feitas;

Ao meu orientador pela oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa e pela sua orientação;

À minha co-orientadora por me ajudar nas etapas da Dissertação;

À Dra. Fabiana Rodrigues pelos conselhos que me fizeram olhar com outros olhos a pesquisa, pela ajuda na discussão e escrita do meu trabalho, e pelos seus ouvidos;

À Silvana Rockenbach Marin que com seu talento natural na pesquisa me ajudou a resolver os problemas práticos;

À Márcia, amiga de todas as horas que com sua calma característica me aconselhava;

À Vera e ao César que me ajudaram na parte prática da pesquisa;

À Paula que durante o Mestrado, e até antes, passou horas adentro estudando,

pelos bons papos, cafés e pela amizade;

À Leidy, Jacqueline e João por fazerem parte dessa etapa na minha vida;

Aos colegas da Equipe de Ecofisiologia que me ajudaram até sob sol escaldante;

Aos colegas que me ajudaram na pesquisa: Maria Thereza, André, Juliana, Juliane, Amanda e Larissa;

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal;

À Dra. Francismar Correa Marcelino e a Dra Maria Cristina Oliveira que demonstraram disponibilidade e uma paciência sem igual ao, juntamente comigo, planejarem, explicarem e concluírem a minha pesquisa;

À Sueli que esteve disponível em todos os momentos que necessitava;

À EMBRAPA Soja que disponibilizou os laboratórios e pessoas capacitadas que me auxiliaram no desenvolvimento do meu trabalho;

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular;

À Universidade Estadual de Londrina;

Ao CNPq pela bolsa cedida durante os dois anos;

Àqueles que de certa forma me ajudaram no desenvolvimento desse trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema em plantas de soja (*Glycine max*, L. Merrill) de modificações fisiológicas desencadeadas em resposta ao déficit hídrico.27
- Figura 2** - **A.** Esquema de ativação dos genes regulados pelos genes *DREB1A* e *DREB2A* sob condições de seca, calor, alta salinidade, H₂O₂ e frio em *Arabidopsis thaliana*, esses genes são divididos em três grupos: induzidos por *DREB2A*, por *DREB1A* e por ambos. **B.** Esquema do funcionamento das proteínas DRIP1 e DRIP2 na degradação do gene *DREB2A* em condições normais de crescimento da planta. Modelo modificado de Sakuma et al., (2006b) e Qin et al., (2008) 39
- Figura 3** - Trifólio de soja esquematizando os tratamentos do experimento de desidratação celular, T0 min (controle), T30 min e T90 min. Cada folíolo foi dividido em três partes e as amostras submetidas ao estresse de desidratação em câmara climatizada BOD, a 30°C e 60 % umidade. R 1, R 2 e R 3 indicam as repetições de cada tempo de tratamento, estas foram retiradas de uma posição diferente em cada um dos folíolos58
- Figura 4** - Árvore filogenética gerada a partir das sequências CDS do gene *DREB* de diversas espécies vegetais. As sequências foram alinhadas com o programa Clustal X e clusterizadas com auxílio do programa MEGA 4.062
- Figura 5** - Análise eletroforética para a verificação de eventos positivos, amplificando fragmentos (1975 pb – promotor ao terminador) da construção gênica *rd29A:AtDREB2A*. Como controles foram utilizados: plasmídeo *AtDREB2A -DREB2A* e *DREB2A/Dral* (DNA digerido com a enzima de restrição *Dral*), controle negativo – amostra da cultivar BR16 não transformada e branco (contaminação da amostra). Para cada evento foram realizadas duas extrações de DNA independentes, de plantas em T₀63
- Figura 6** - Análise eletroforética para verificar a ocorrência de quimerização. Três diferentes amostras de DNA coletadas dos eventos P 1397 e P 2193 foram avaliadas e amplificadas com o par de *primers* específicos para a construção gênica *rd29A:AtDREB2A* (1975 pb). Controle positivo: plasmídeo *AtDREB2A -29ADREB2A* e *29ADREB2A-Dral* (DNA digerido com a enzima de restrição *Dral*), controle negativo – amostra da cultivar BR16 não transformada e branco (contaminação da amostra)64

- Figura 7** - Comparação da expressão gênica relativa do transgene *AtDREB2A* nas gerações T₀ e T₁ do eventos P 1397 e P 2193, sob condições de desidratação celular. A expressão do transgene foi normalizada com os genes referências *GmrRNA18S* na geração T₀ e *Gmβ_actina* e *GmrRNA18S* na geração T₁ e calibrada com relação a planta controle BR16 (**A**) e com o tempo T0 min de cada evento (**B**). As análises foram realizadas pelo Programa *RESTmsc* 70
- Figura 8** - Comparação da expressão gênica relativa do transgene *AtDREB2A* na geração T₂ do evento P 2193 em folhas e raízes sob condições de estresse hídrico. A expressão do transgene foi normalizada com os genes referências *GmrRNA18S* e *Gmβ_actina* e calibrada com relação ao transgene no tempo T0 min do mesmo evento. As análises foram realizadas pelo Programa *RESTmsc*. 72
- Figura 9** - Comparação da expressão gênica relativa do transgene *AtDREB2A* na geração T₂ do evento P 2193 em folhas e raízes sob condições de estresse hídrico. A expressão do transgene foi normalizada com os genes referências *GmrRNA18S* e *Gmβ_actina* e calibrada com os respectivos tempos da planta controle BR16 ($p > 0,001$). As análises foram realizadas pelo Programa *RESTmsc*. 73
- Figura 10** - Comparação da expressão gênica relativa do transgene *AtDREB2A* na geração T₀, T₁ e T₂ do evento P 2193 em folhas e raízes sob condições de estresse hídrico. A expressão do transgene foi normalizada com os genes referências *GmrRNA18S* na T₀ e *Gmβ_actina* e *GmrRNA18S* na T₁ e T₂ e calibrada com relação ao transgene no tempo T0 min do mesmo evento em cada um dos experimentos. As análises foram realizadas pelo Programa *RESTmsc* 74
- Figura 11** - Respostas fisiológicas da planta controle BR 16 e do evento transgênico P 2193 não estressados e estressados. Os tempos de estresse foram de T30 min, T60 min e T90 min. **A** Taxa Fotossintética, **B** Condutância Estomática, **C** Taxa de Transpiração, **D** Temperatura do Ambiente – Temperatura Foliar. Os traços verticais entre as linhas correspondem ao erro padrão. Nos pontos onde os traços não se sobrepõem indicam diferenças pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$)..... 75
- Figura 12** - Modelo esquemático do plasmídeo pBluescript II SK que após digerido gerou o inserto (promotor RD29A + *DREB2A* 136-165 + terminador NOS) usado na transformação..... 101

Figura 13 - Modelo esquemático do plasmídio pAC321 contendo a sequência do gene <i>AHAS</i> (promotor/ <i>Ahas</i> 5'UTR + <i>Ahas</i> CDS + <i>Ahas</i> 3'UTR) de <i>Arabidopsis thaliana</i> , que após digerida foi usada na transformação.....	101
Figura 14 - <i>Gene gun</i> utilizado no bombardeamento dos embriões de soja BR16, com as construções contendo o gene <i>AtDREB2A</i> e <i>AHAS</i> , com todos os materiais utilizados durante o processo	102
Figura 15 - A Copos com meio BAP onde os embriões se recuperavam após o processo de transformação. B Copos em areia:vermiculita em processo de aclimação.....	102
Figura 16 - A Exemplo de plantas <i>AtDREB2A</i> positivas. B Sementes T ₁ dos eventos P 1397 e P 2193	103
Figura 17 - Experimento de desidratação celular com amostras de folha dos eventos GM P1397 e P2193 realizado em câmara climatizada: as amostras T 30 min e T 90 min foram submetidas à desidratação celular a 30°C e 59% umidade	103
Figura 18 - Evento P 2193 em crescimento no sistema hidropônico, A Plântulas de soja com três dias de crescimento, B Raízes de plantas de soja com 13 dias de crescimento e C Folhas e raízes de soja com 13 dias	104
Figura 19 - Curva de diluição utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação do gene <i>GmrRNA18S</i> . A amostra de cDNA do evento P 1397 foi diluída serialmente e amplificada em sistema <i>singleplex</i> . A inclinação da reta (<i>slope</i>) foi utilizada para o cálculo da eficiência com base na fórmula ($E=10^{-1/slope} - 1$). A eficiência obtida foi utilizada na quantificação relativa do transgene <i>AtDREB2A</i> no Experimento de Desidratação Celular geração T ₀	101
Figura 20 - Curva de diluição utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação do transgene <i>AtDREB2A</i> , <i>primers</i> e sonda separados. A amostra de cDNA do evento P 1397 foi diluída serialmente e amplificada em sistema <i>singleplex</i> . A inclinação da reta (<i>slope</i>) foi utilizada para o cálculo da eficiência com base na fórmula ($E=10^{-1/slope} - 1$). A eficiência obtida foi utilizada na quantificação relativa do transgene <i>AtDREB2A</i> no Experimento de Desidratação Celular geração T ₀	105

- Figura 21** - Curva de diluição utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação do gene *β_actina*, *primers* e sonda separados. A amostra de cDNA do evento P 2193 foi diluída serialmente e amplificada em sistema *singleplex*. A inclinação da reta (*slope*) foi utilizada para o cálculo da eficiência com base na fórmula ($E=10^{-1/slope} - 1$). A eficiência obtida foi utilizada na quantificação relativa do transgene *AtDREB2A* no Experimento de Desidratação Celular geração T₁ e na Hidroponia 105
- Figura 22** - Curva de diluição utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação do transgene *GmrRNA18S*, *primers* e sonda separados. A amostra de cDNA do evento P 2193 foi diluída serialmente e amplificada em sistema *multiplex*. A inclinação da reta (*slope*) foi utilizada para o cálculo da eficiência com base na fórmula $n (E=10^{-1/slope} - 1)$. A eficiência obtida foi utilizada na quantificação relativa do transgene *AtDREB2A* no Experimento de Desidratação Celular geração T₁ e na Hidroponia 106
- Figura 23** - Curva de diluição utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação do transgene *AtDREB2A* (*assay*). A amostra de cDNA do evento P 2193 foi diluída serialmente e amplificada em sistema *multiplex*. A inclinação da reta (*slope*) foi utilizada para o cálculo da eficiência com base na fórmula ($E=10^{-1/slope} - 1$). A eficiência obtida foi utilizada na quantificação relativa do transgene *AtDREB2A* no Experimento de Desidratação Celular geração T₁ e na Hidroponia..... 106
- Figura 24** - Curva de diluição utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação do transgene *AtDREB2A* (*assay*). A amostra de DNA do evento P 1397 foi diluída serialmente e amplificada em sistema *multiplex*. A inclinação da reta (*slope*) foi utilizada para o cálculo da eficiência com base na fórmula ($E=10^{-1/slope} - 1$). A eficiência obtida foi utilizada na quantificação relativa do número de cópias do transgene 107
- Figura 25** - Curva de diluição utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação do gene referênica *Lectina* (*GmLec*). A amostra de DNA do evento P 1397 foi diluída serialmente e amplificado em sistema *multiplex*. A inclinação da reta (*slope*) foi utilizada para o cálculo da eficiência com base na fórmula ($E=10^{-1/slope} - 1$). A eficiência obtida foi utilizada na quantificação relativa do número de cópias do transgene 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos <i>primers</i> usados na amplificação por PCR para confirmação dos eventos positivos e tamanho do fragmento amplificado	55
Tabela 2 - Sequências de <i>primers</i> e sondas dos genes <i>AtDREB2A</i> e <i>GmLec</i> , usados para o cálculo do número de cópias inseridas no genoma da soja, e o tamanho esperado do fragmento amplificado	56
Tabela 3 - Sequências de <i>primers</i> e sondas dos genes <i>GmrRNA18S</i> , <i>Gmβ_actina</i> e <i>AtDREB2A</i> , utilizados para análise de expressão gênica e o tamanho esperado dos fragmentos amplificados	60
Tabela 4 - Teste de qui-quadrado com base nas leis de segregação Mendeliana realizado para calcular a segregação do transgene <i>AtDREB2A</i> no evento P 2193, nas gerações T ₁ e T ₂	65
Tabela 5 - Quantificação relativa para o número de cópias do transgene <i>AtDREB2A</i> nas gerações T ₀ e T ₁ , utilizando o método $2^{-\Delta Ct}/2$. A 1ª coluna apresenta os eventos selecionados; a 2ª e 3ª mostram os resultados dos experimentos independentes e na 4ª coluna a média dos três experimentos, a 5ª, 6ª, 9ª mostram, respectivamente, o desvio padrão (SD), coeficiente de variação (CV%) e o número de cópias estimado	66
Tabela 6 - Valores de eficiência calculada para cada gene na quantificação relativa do transgene <i>AtDREB2A</i> . Valores calculados pela curva de diluição do cDNA dos valores dos experimentos, dado o <i>slope</i> de cada curva	67
Tabela 7 - Expressão Relativa do transgene <i>AtDREB2A</i> analisada pelo programa <i>RESTmsc</i> . O Erro Padrão (SE) é calculado em relação à mediana, p_value (0,1). Valores UP (do inglês <i>up-regulated</i>) presentes no gráfico indicam valores significativamente diferentes do grupo controle	68
Tabela 8 - Expressão Relativa do transgene <i>AtDREB2A</i> analisada pelo programa <i>RESTmsc</i> . O Erro Padrão (SE) é calculado em relação à mediana, p_value (0,1). Valores UP (do inglês <i>up-regulated</i>) presente no gráfico indicam valores significativamente diferentes do grupo controle	71
Tabela 9 - Interação entre o tempo de estresse e as cultivares para a Taxa Fotossintética	108
Tabela 10 - Interação entre o tempo de estresse e as cultivares para Condutância Estomática	108

Tabela 11 -Interação entre o tempo de estresse e as cultivares para a Taxa de Transpiração	108
Tabela 12 -Interação entre o tempo de estresse e as cultivares para a Diferença Ambiental e Foliar	108

LISTA DE ABREVIACÕES

ABA	cido abscísico;
ABRE – ABA	<i>binding responsive element</i> - elemento de ligação resposivo ao ABA
AHAS	cido hidroxiactico sintase, enzima que participa na reação de síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina, conferem resistência ao agente de seleção, o herbicida imazapir
AMV-RT	Transcriptase reversa isolada de aves
AOS	<i>active oxygen species</i> - espécies ativas de oxigênio
APETALA2	Primeira proteína que foi identificada o domínio AP2
APX	Ascorbato peroxidase
AP2	Domínio conservado de aproximadamente 60 aminoácidos encontrado AP37 – Fator de transcrição da família APETALA2 (AP2); nas proteínas DREB
AREB/ABF – ABA	<i>Responsive Element Binding protein / ABA – responsive</i>
AtDREB2A	Gene <i>DREB2A</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BiP	<i>Binding Protein</i> – Proteína Ligante
CaMV 35S	Promotor constitutivo do vrus do mosaico do tabaco
CRT	<i>C-repeat e low-temperature-responsive</i>
Ct	Limiar do ciclo
CuZn SOD	Superxido dismutase CuZn
DRE	<i>Dehydration Element Responsive</i> - elemento responsivo  desidratação, DREB - <i>Dehydration Responsive Element Binding</i> - Elemento ligante de resposta  desidratação, DREB2A – <i>Dehydration Responsive Element Binding 2A</i> - Elemento ligante de resposta  desidratação 2A
DRIP1 e DRIP2 – DREB2A	<i>Interacting Proteins Function</i> - Proteínas que interagem com <i>DREB2A</i> ;
ERD14	<i>early response to dehydration</i> - resposta precoce para a desidratação 14
F_{2, 3 ... n}	Segunda, Terceira, ... n, geração de um cruzamento
GmLec	Gene Lectina de <i>Glycine max</i>

GmrRNA18S	Gene ribossomal 18S de <i>Glycine max</i>
GPX	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GST	Glutaciona S-transferase
InsP	Inositol fosfatases
LEA	<i>Late Embryogenesis Abundant</i> - embriogênese abundante tardia
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> – proteína quinase ativadora de mitogenio
MMLV-RT	Transcriptase reversa isolada a partir de murinos;
MS	<i>Murashige Skoog Basal Medium Salt</i> – Meio salino Murashige Skoog
MYC	<i>Myelocytomatosis oncogene</i> – oncogene mielocimatose
MYB	<i>Myeloblastosis oncogene</i> – oncogene mielobastose
NACRS – NAC	<i>recognition sequence</i> ; sequência de reconhecimento ao NAC
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo – P
OPC	Região de catabolismo de opinas
ORI+INC	Região de replicação
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PGM	Plantas Geneticamente Modificadas
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIB	Produto Interno Bruto
PLD	Fosfolipase D
PP2C	Fosfatase
pTi	Plasmídeo de transferência
P5CS	D1-pirrolina-5-carboxilato sintetase
qPCR	PCR quantitativo;
RING	Domínio essencial para a atividade E3 ligase encontrado nas proteínas DRIP1 e DRIP2, domínio rico em Cys e oito resíduos ligantes coordenados por íons zinco em uma estrutura <i>cross-brace</i>
RLK	Receptores como quinases ou histidina quinase (HK)
RN⁺	Emissão da fluorescência em cada ponto de captação

RN⁻	Emissão de fluorescência no baseline (<i>background</i>)
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
RT-PCR	<i>Real time polymerase chain reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; RuBP – Rubisco
sHSP	(<i>Small heat shock proteins</i>) pequenas proteínas de choque térmico
SLN	Sinais de localização nuclear
SNF1/AMP	Proteína quinase ativada por serina e treonina, descoberta pela primeira vez em levedura, denominada então de quinases não fermentadoras de sacarose
SOD	Superóxido dismutase
TRA	Região de transferência
T_{0, 1, 2 ... n}	Plantas da primeira, segunda ... n geração transformada
T0, 30, 60 e 90	Tempo de 0, 30, 60 e 90 minutos
T30	Tempo de 30 minutos;
T90	Tempo de 90 minutos;
UTR	<i>Untranslated Region</i> - Região não traduzida
ZF-HD	<i>Zinc-finger homeodomein</i> - homodomínio de dedo de zinco
ZF-HD	Fatores de transcrição de homeodomínios
ZmNF-YB1	Fator de transcrição da família do fator nuclear Y (NF-Y);
ΔRn	Valores da degradação da sonda durante o processo de amplificação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVO GERAL	23
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
3.1	RELAÇÕES HÍDRICAS DAS PLANTAS	26
3.2	MODIFICAÇÕES FISIOLÓGICAS E MORFOLÓGICAS DESENCADEADAS EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO	26
3.3	MECANISMOS MOLECULARES DESENCADEADOS EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO	34
3.4	FATORES DE TRANSCRIÇÃO	35
3.4.1	Elemento Ligante de Resposta à Desidratação e ao Calor- Dreb2a (Dehydration Responsive Element Binding)	38
3.5	MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO EM PLANTAS	44
3.6	Métodos de Análise Molecular	47
3.6.1	Southern Blot	48
3.6.2	PCR Quantitativo (qPCR)	48
4	ARTIGO	52
1	INTRODUÇÃO	52
2	MATERIAIS E MÉTODOS	53
2.1	Desenho de Primers e Árvore Filogenética	53
2.2	OBTENÇÃO DE PLANTAS DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADAS COM O GENE ATDREB2A, POR BIOBALÍSTICA	54
2.2.1	Biobalística	54
2.2.2	Extração de DNA e Análise Via PCR Convencional	55
2.3	ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DO TRANSGENE NO GENOMA DA SOJA VIA PCR QUANTITATIVO	56
2.3.1	Método $2^{-\Delta Ct/2}$	57

2.4	ANÁLISE DA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE AtDREB2A EM PLANTAS DE SOJA GMs	57
2.4.1	Experimento de Desidratação Celular	57
2.4.2	Experimento de Hidroponia	58
2.4.3	Extração de RNA e Síntese de cDNA.....	59
2.4.4	Quantificação da Expressão Gênica Relativa Via PCR Quantitativo (qPCR).....	60
3	RESULTADOS	61
3.1	ALINHAMENTO GLOBAL	61
3.2	OBTENÇÃO DE PLANTAS DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADAS	63
3.3	ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DO TRANSGENE ATDREB2A NO GENOMA DA SOJA	65
3.4	Análise da Expressão Gênica do Transgene AtDREB2A em Soja GM Sob Condições de Estresses Abióticos	67
3.4.1	Expressão Gênica do Transgene AtDREB2A em Ensaios de Desidratação Celular	67
3.4.2	Experimento de Hidroponia no Evento P 2193 na Geração T2	71
4	DISCUSSÃO	77
5	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	87
	ANEXOS	102
	ANEXO A – Figuras	103
	ANEXO B – Tabelas.....	110

ENGELS, Cibelle. **Obtenção e caracterização de plantas de soja geneticamente modificadas com o gene *ATDREB2A* usando tolerância à seca.** 2010. 110f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

As plantas estão expostas a diferentes condições ambientais e, entre estas, a seca é um fator abiótico causador de reduções de até 50% da produtividade. Nos estados do Sul do Brasil, a estiagem ocorrida na safra brasileira de 2004/2005, provocou perdas de U\$ 2,32 bilhões. Para tentar diminuir os prejuízos, a biotecnologia vem utilizando diversas técnicas, como a transformação genética vegetal para a inserção de genes de interesse visando à obtenção de uma cultivar mais tolerante ao déficit hídrico. A família gênica DREB, genes ABA independentes, são classificados como genes responsivos a estresses abióticos, inclusive à seca. O gene *DREB2A* transcreve um fator de transcrição que regula uma cascata de genes responsivos à seca, ao calor, à salinidade e ao H₂O₂, e já foi caracterizado em diversas culturas como soja, milho, arroz e girassol. No presente estudo o gene *AtDREB2A*, isolado de *A. thaliana*, foi inserido em soja (*Glycine max* L. Merrill) via biobalística, por co-transformação com o gene *AHAS*, gene de seleção que confere resistência ao herbicida imazapir. As plantas geradas foram caracterizadas quanto ao número de cópias inseridas, estabilidade do transgene e nível de expressão gênica, via PCR quantitativo, em condições de déficit hídrico. Os tratamentos de deficiência hídrica foram aplicados em dois experimentos: um de desidratação celular, em condições controladas de temperatura e umidade e outro de hidroponia, esgotando-se a solução nutritiva de caixas plásticas e expondo as raízes das plantas ao ambiente. Como resultado, setenta e oito plantas positivas e vivas foram obtidas, com uma eficiência de transformação de 1,19%. Os eventos P 1397 e P 2193 apresentaram aproximadamente de 9 a 17 e 72 a um elevado número de cópias na geração T₀, e de 1 a 3 e 2 a 5 cópias na geração T₁, sendo que o evento P 2193 segregou de maneira independente na geração T₁. Quanto à quantificação relativa da expressão gênica, o evento P 1397 apresentou resultados significativos no experimento de desidratação celular nos tratamentos aplicados de T30 min (142,105 p>0,001) e T90 min (36,96 p>0,038) quando comparados com o T0 min. No experimento de hidroponia, a geração T₂ do evento P 2193, indicou que, quando os tratamentos foram comparados com o tempo T0 min do próprio evento, apenas o T60 min (30,30 p>0,003) das raízes apresentou expressão do gene mais significativa. Estes resultados sugerem que os eventos positivos estão superexpressando o transgene *AtDREB2A*, em condições de estresse por déficit hídrico. Ainda foi possível observar uma expressão diferencial entre os tecidos avaliados, uma vez que, as raízes expressam mais o transgene quando comparadas com as folhas, ambos tecidos submetidos a déficit hídrico por hidroponia tanto quando foi utilizada a cultivar não transgênica BR16 como calibradora quanto o tempo T0 min do evento testado. Os resultados obtidos de quantificação e número de cópias sugerem que o transgene foi inserido com sucesso em local de expressão no genoma e que não houve silenciamento. No entanto, novos estudos devem ser realizados visando à obtenção de maiores informações quanto a um possível aumento da tolerância a condições de estresse hídrico, nas plantas de soja GMs obtidas.

Palavras-chave: Tolerância. *AtDREB2A*. Cascata gênica. Déficit hídrico. *Glycine max* (L. Merrill).

ENGELS, Cibelle. **Preparation and characterization of genetically modified soybean plants with the gene *ATDREB2A* using drought tolerance**. 2010. 110f. Dissertation (Master in Genetics and Molecular Biology) - State University of Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Plants are exposed to different environmental conditions and among them drought is an abiotic factor that causes reductions of 50% on productivity. In the south states of Brazil, drought period that occurred in 2004/2005 crop season causes losses of US\$ 2.32 billion. To reduce damages, biotechnology uses many techniques, such as plant transformation, to insert interested genes aiming to obtain a soybean cultivar more tolerant to water deficit. The DREB gene family, ABA independent genes, are classified as responsive genes to abiotic stresses, including drought. *DREB2A* gene encodes for a transcription factor that target a cascade gene in response to drought, heat, salinity and H₂O₂ and has been characterized in many crops such as soybean, corn, rice and sun flower. In the present work, *AtDREB2A* gene, isolated from *A. thaliana*, was inserted in soybean (*Glycine max* L. Merrill), trough biobalistics, by co-transformation with AHAS gene, a selection gene that confer resistance to the herbicide imazapir. The generated plants were characterized to inserted copy number, transgene stability and gene expression level, using qPCR, in water deficit conditions. Drought treatments were conducted in two experiments: one imposing cellular dehydration, in controlled conditions of temperature and humidity and other in hydroponics system, taking out the roots from the nutrition solution and exposing the roots to the environmental. As a result, seventy - eight positive and survived plants were obtained, resulting in a transformation efficiency of 1.19%. P 1397 and P 2193 events presented approximately from 10 to 50 copies in T₀ generations and from 2 to 7 and 2 to 8 copies, respectively, in T₁ generation, with P 2193 event segregating independently in T₁. The relative quantification of gene expression of P 2193 event, in the cellular dehydration experiment, showed a differentially gene expression in T₀ and T₁ generations, in T30 min and T90 min when compared to control plant, BR16. The event P 1397 showed significant results in the dehydration experiments, in the T30 min and T90 min of treatments, when compared to T0 min. In the hydroponics system, the T₂ generation from the P 2193 event, when treatments were compared to T0 min from it's own event, showed a higher significant expression only at T60 min, in roots and when compared to control plant in all treatment times, including T0 min, transgene was differentially expressed. These results suggests that positive events are expressing the *AtDREB2A* transgene, in water deficit conditions and also that differential gene expression occurred once roots expressed the transgene in higher levels when compared to expression presented in the leaves. The obtained results from gene expression quantification and copy number suggest that the transgene was inserted successfully in an expression site of the genome and that no transgene silencing occurred. However, new studies should be performed aiming to obtain more information about a possible increase on water stress tolerance, in the GM soybean plants obtained.

Keywords: Tolerance. *AtDREB2A*. Cascade. Water deficit. Over expression.

1 INTRODUÇÃO

A soja, *Glycine max*, é um dos principais produtos da economia brasileira, movimentando cerca de US\$ 50 bilhões anuais e influenciando diversos setores da sociedade, principalmente os relacionados aos complexos de produção, transporte e comercialização (Bonato e Bonato, 1987).

Nosso país é o segundo maior produtor mundial do grão tendo como principal mercado consumidor a Europa, que adquire cerca de 75% das exportações brasileiras (Associação Nacional de Biossegurança - ANBIO, 2006). Segundo estimativas, a exportação gerada pelo complexo da soja movimentará 15,011 milhões de dólares no ano de 2010, sendo a exportação do grão responsável por 10,080, do farelo 3,9, e do óleo 1,0131 milhão de dólares (Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais – ABIOVE, 2010). Segundo a CONAB (Companhia Nacional do Abastecimento), dentre as principais culturas brasileiras, a soja foi a que apresentou o maior crescimento na safra 2009/10, com um aumento de área de 6,7%, aproximadamente 1,47 milhão ha. Além do aumento na área plantada, o crescimento de 18,2% ou 10,4 milhões de toneladas na produção deu-se também em razão das condições climáticas favoráveis durante o desenvolvimento da cultura que permitiram o bom desenvolvimento da cultura e uma produção resultante de 67,57 milhões de toneladas (CONAB, 2010).

Apesar dos números positivos das últimas safras, os níveis de produção ainda podem ser melhorados. Para a total expressão do potencial produtivo da cultura, as condições às quais a planta está submetida devem ser ótimas. Entretanto, nas condições naturais de lavoura, uma série de fatores abióticos e bióticos, atuando juntos ou isoladamente, fazem com que as condições ótimas de cultivo dificilmente sejam atingidas (Bonato, 2000). Com o aquecimento global que vem modificando o clima mundial nas últimas décadas, a tendência é que eventos de secas e alterações na quantidade de chuvas se tornam cada vez mais frequentes (Stokstad, 2004; Schiermeier, 2006).

Considerando apenas os fatores abióticos de modo isolado, o déficit hídrico reduz consideravelmente os rendimentos em lavouras de soja, especialmente durante a fase reprodutiva, resultando em perdas significativas (EMBRAPA, 2005). Dentre os eventos de seca que afetaram a sojicultura no país, destaca-se a safra de 2003/04 quando a redução na produtividade foi de 2,5%

quando comparada à safra do ano anterior de 123,1 milhões de toneladas de grãos e ainda a safra 2004/05, quando os estados do sul perderam aproximadamente 25% da sua produção, somando U\$ 2,32 bilhões de perdas diretas, e entrando para a história como a pior safra do país (IBGE, 2009).

Existem várias alternativas para amenizar os problemas decorrentes da deficiência hídrica, como o manejo adequado da lavoura e do solo, utilizando práticas como o plantio direto que preserva mais água no solo, assim como o correto controle de ervas daninhas que competem com a cultura por água. Outras estratégias são também utilizadas visando a diminuição das perdas causadas pelo déficit hídrico, como o plantio de cultivares estabelecidas para determinadas regiões em épocas recomendadas e o uso da irrigação, que apresenta sérios obstáculos, como o custo, a disponibilidade e a prospecção de recursos hídricos.

Outra alternativa utilizada para mitigar as perdas de produtividade causadas pela estiagem é o uso de cultivares tolerantes à seca. Dentro de um programa de melhoramento genético clássico para tolerância a seca, algumas dificuldades surgem para o melhorista na seleção de linhagens tolerantes como, por exemplo, a quantificação exata do efeito do estresse (Scott e Fischer, 1993). Atualmente, a rápida evolução de técnicas de biotecnologia, como seqüenciamentos em larga escala, RNA *sequencing*, silenciamento entre outros, possibilitou não só identificar fisicamente todos os genes envolvidos em uma determinada resposta fenotípica, como também isolar com precisão as sequências de DNA responsáveis por determinada característica. Neste contexto, as técnicas de engenharia genética aliadas às técnicas de transformação vegetal têm permitido alterar a composição de componentes individuais de rotas metabólicas específicas das plantas no sentido de aumentar as defesas contra estresses bióticos e abióticos, indo além do que se consegue através das práticas de melhoramento convencional (Borém, 2004).

Muitos grupos de pesquisa vêm trabalhando com diferentes genes que conferem tolerância à seca. Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki (2000), trabalhando com genes envolvidos na resposta a desidratação em *Arabidopsis thaliana*, identificaram a presença de genes da família DREB (*Dehydration Responsive Element Binding* - Elemento de ligação responsivo à desidratação), que codificam fatores de transcrição envolvidos nas respostas das plantas à seca, ao frio, ao calor e à alta salinidade. A pesquisadora Yamaguchi-Shinozaki do JIRCAS (*Japan International Research Center for Agricultural Science*) e seu grupo de

pesquisa desenvolveram construções gênicas com genes DREB e obtiveram plantas de tabaco, amendoim entre outras espécies vegetais, mais tolerantes à seca. Este grupo, em colaboração científica com a EMBRAPA Soja (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Soja), cedeu construções gênicas contendo o promotor estresse induzido *rd29A* e os genes *DREB1A* e/ou *DREB2A* para que cultivares de soja fossem geneticamente modificadas (GMs). Dessa maneira, após a inserção da construção *rd29A:AtDREB1A* em plantas de soja foi possível observar em condições controladas de casa de vegetação, um aumento na tolerância das plantas GMs à seca. Os estudos com o gene *DREB1* continuam, entretanto, novos estudos foram propostos utilizando outro gene da família DREB, o gene *AtDREB2A*, que confere tolerância ao déficit hídrico e também ao calor, estresse que habitualmente acompanha situações de seca.

Neste cenário, a introdução da construção gênica *rd29A:AtDREB2A* CA (contendo o promotor estresse induzido *rd29A* e a região codante do gene *DREB2A* de *A. thaliana*) em soja, pela técnica de biobalística, poderá ser uma estratégia eficaz na obtenção de genótipos de soja mais tolerantes a seca e ao calor, uma vez que, a utilização dessa técnica tem grande potencial na introdução direta de genes que modificam características de interesse agrônomo, mantendo as características originais da cultivar e evitando a transferência de características deletérias (Peña et al., 1995).

2 OBJETIVO GERAL

Obter plantas de soja geneticamente modificadas com a construção gênica *rd29A:AtDREB2A* CA visando desenvolver uma cultivar com maiores níveis de tolerância à seca.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Obter plantas de soja GMs, por co-transformação, através da introdução, via biobalística, do cassete de expressão contendo o promotor estresse induzido *rd29A* e a região codante do gene *AtDREB2A* de *Arabidopsis thaliana*, e da construção contendo a região codante do gene *ahas*, que codifica a enzima acetohidróxi ácido sintetase de *A. thaliana* modificada (EC2.2.1.6) conferindo tolerância ao agente de seleção imazapir;
- 2) Avaliar a estabilidade da integração do transgene nos eventos positivos gerados via PCR convencional e análise da segregação das plantas obtidas em sucessivas gerações;
- 3) Quantificar os níveis de expressão gênica do fator de transcrição *AtDREB2A* durante condições de estresse hídrico, através da técnica de PCR em tempo real e;
- 4) Quantificar o número de cópias do cassete inserido *rd29A:AtDREB2A* CA nos eventos positivos gerados, através da técnica de PCR em tempo real.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As plantas estão expostas a diferentes tipos de estresses ambientais, e como resposta a estes, os vegetais realizam uma série de modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, visando aumentar sua tolerância ao estresse (Bray, 2004). Dentre estes efeitos abióticos, a seca destaca-se como a principal responsável pelas oscilações anuais na produção brasileira de soja, diminuindo em mais de 50% o rendimento médio da maioria das culturas de grãos (Farias et al., 1995).

A ocorrência de eventos de seca aumentou muito nas últimas décadas, provavelmente associado às mudanças climáticas decorrentes do aquecimento global (Stokstad, 2004; Schiermeier, 2006). O relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças do Clima (IPCC – *Intergovernmental Panel for Climate Changes*) prevê para os próximos 100 anos, um aumento da temperatura do planeta entre 1,4°C e 5,8°C, considerando os efeitos naturais e as ações antropogênicas sobre o ambiente.

Ainda segundo estudos da Embrapa Informática Agropecuária (CNPTIA) e da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), o aumento da temperatura média da Terra em até 5,8°C em 100 anos reduzirá as áreas de cultivo de café, arroz, feijão, milho e soja praticamente pela metade da área atual plantada. Para o cultivo da soja, essa redução poderá alcançar até 1,2 milhões de km² (AGÊNCIA CT, 2005).

Existem algumas alternativas para amenizar os problemas de deficiência hídrica, como o manejo adequado da lavoura e do solo, o manuseio de cultivares recomendadas e o uso da irrigação, que apresenta custos elevados e requer a disponibilidade de recursos hídricos. Outra possibilidade é o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas às condições de déficit hídrico; no entanto, algumas dificuldades surgem para o melhorista na seleção de linhagens tolerantes ao estresse, como a quantificação do efeito do estresse, ora por falta de metodologia de avaliação, tendo em vista a complexidade dos mecanismos envolvidos, ora pela instabilidade e intensidade da ocorrência do fator de estresse (Beever, 2000).

Entretanto, nas últimas décadas, com a evolução no desenvolvimento de técnicas de biotecnologia, é possível não somente identificar

fisicamente todos os genes envolvidos em uma determinada resposta fenotípica, como também isolar com precisão as sequências de DNA responsáveis por uma determinada característica. Neste sentido, as técnicas de engenharia genética, aliadas as técnicas de transformação vegetal, têm permitido alterar a composição de componentes individuais das plantas, no sentido de aumentar as defesas contra estresses bióticos e abióticos, indo além do que se consegue alcançar através de práticas de melhoramento convencional (Borém, 2004).

No contexto global, a possibilidade de introduzir características de interesse que possibilitem a solução de problemas agrônômicos e que agreguem valor aos produtos agrícolas fez com que muitos países optassem pela utilização de plantas geneticamente modificadas (PGMs). Em 2009, dos 25 países que plantam PGMs, 15 são países em desenvolvimento e 10 industrializados. No topo do *ranking* estão os EUA, com 64 milhões de hectares plantados, seguido do Brasil, com 21,4 milhões de hectares semeados, principalmente com soja, milho e algodão GMs e em terceiro lugar encontra-se a Argentina, com 21,3 milhões de hectares (ISAAA, 2009). Seguindo esta tendência, vários grupos de pesquisas nacionais e internacionais têm trabalhado com o desenvolvimento de estratégias moleculares que visem criar PGMs capazes, por exemplo, de suportar longos períodos em condições de deficiência hídrica, entre outras linhas de pesquisa (Nodari e Guerra, 2001).

É necessário, ainda, para que o preço das sementes no mercado nas próximas décadas fique equilibrado, a manutenção da competitividade da soja brasileira, que depende, primordialmente da capacidade de instituições públicas e privadas brasileiras, em desenvolver variedades comerciais de soja GMs que atendam às necessidades dos produtores brasileiros e do mercado consumidor. Essas estratégias devem compreender desde a descoberta, o desenvolvimento e proteção intelectual de processos moleculares que visem solucionar problemas agrônômicos e agregar valor à cultura, até a busca de parceiros internacionais que tenham interesses comerciais com o Brasil e, que, possuam tecnologias que favoreçam a sojicultura brasileira. Infelizmente, o Brasil ainda investe pouco em Pesquisa e Desenvolvimento (1,5%) em relação ao seu PIB (Produto Interno Bruto), quando comparado ao investimento feito sobre PIBs de países desenvolvidos como os EUA (2,6%), Japão (3,06%) e Israel (4,73%) (MCT, 2006).

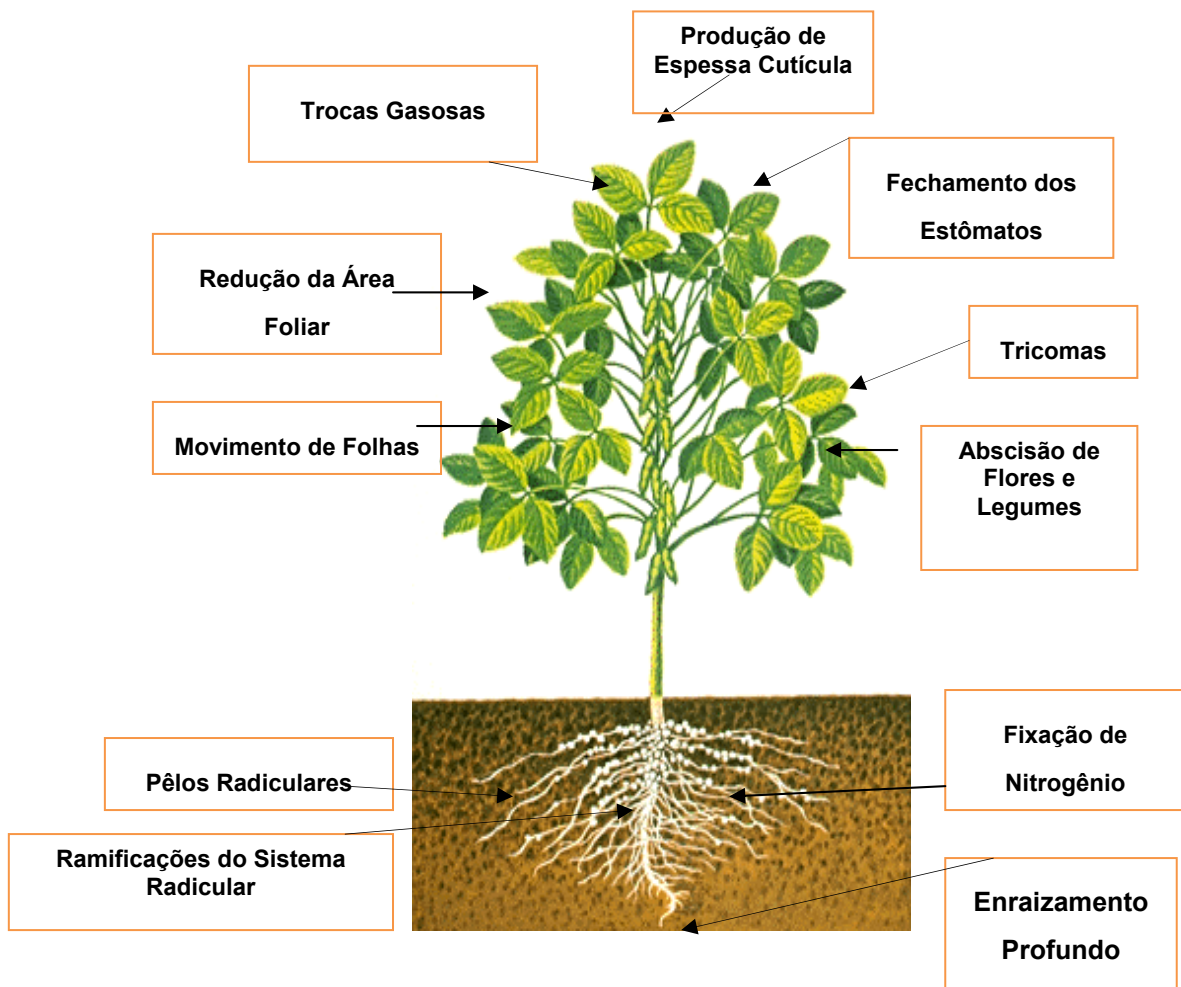
3.1 RELAÇÕES HÍDRICAS DAS PLANTAS

As plantas estão expostas a diversas variações das condições ambientais, que acabam por influenciar no equilíbrio do metabolismo celular. Sob essas condições, as plantas perdem o equilíbrio entre os processos metabólicos, entrando em estresse e consecutivamente gerando respostas específicas ou múltiplas que afetam o organismo como um todo. No princípio as mudanças e respostas nos níveis funcionais são reversíveis, porém, se as condições inóspitas persistirem essas mudanças podem se tornar permanentes (Larcher, 2000).

De modo geral, as plantas necessitam de água para realizarem muitas de suas funções vitais, entre elas a fotossíntese. Quando a água disponível fica limitada, as plantas diminuem a produção de carboidratos e suas funções vitais ficam debilitadas. Os efeitos da intensa demanda evaporativa da atmosfera podem ser agravados quando há um sistema radicular pouco desenvolvido e sem muita profundidade. A deficiência hídrica em plantas também pode ocorrer em ambientes sem problema de falta de água, em situação em que as plantas são submetidas ao congelamento ou em solos com altas concentrações salinas ocorrendo o que se chama de “seca fisiológica” ocasionado pela perda de água por parte das células vegetais. A intensa evaporação, causada pela demanda evaporativa do ar e os altos níveis de radiação normalmente ocasionam a dessecação do solo e tecidos vegetais. Essa alta evaporação somada à baixa precipitação resulta na aridez do solo. Esse estado em que o conteúdo de água do tecido está abaixo do conteúdo adequado no estado de maior hidratação é denominado de déficit hídrico (Larcher, 2000). As plantas podem responder a esses estresses por adaptações estruturais, anatômicas, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas.

3.2 MODIFICAÇÕES FISIOLÓGICAS E MORFOLÓGICAS DESENCADEADAS EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO

Figura 1 - Esquema em plantas de soja (*Glycine max*, L. Merrill) de modificações fisiológicas desencadeadas em resposta ao déficit hídrico.



Fonte: Foto retirada do site <http://www.howstuffworks.com/legumes/soybean-info.htm/printable>.

Uma adaptação observada em plantas encontradas em ambientes com verões secos e longos períodos de estiagem, é a produção de áreas foliares pequenas. As plantas que possuem crescimento inicial acelerado podem produzir áreas foliares maiores e produzirão sementes apenas as que possuem água disponível. Outra adaptação de defesa ao déficit hídrico é a produção de uma espessa cutícula, que é responsável pela redução da transpiração cuticular (Isaacson et al., 2009). Os movimentos foliares também são considerados uma das adaptações das plantas, pois, diminuem o ângulo de incidência dos raios solares e conseqüentemente reduzem o aquecimento foliar e a perda de água, que normalmente acompanha as condições de seca (Taiz e Zeiger, 2004) (Figura 01).

Em condições de déficit hídrico leve ou moderado, as raízes continuam a crescer, pois, o direcionamento dos fotoassimilados possibilita que elas

cresçam em direção as zonas mais úmidas do solo, diminuindo a quantidade de raízes superficiais. Esta resposta torna-se um problema quando a planta está em estágio reprodutivo porque os assimilados são dirigidos também aos frutos, diminuindo o crescimento das raízes e conseqüentemente a absorção de água, tornando as plantas ainda mais sensíveis durante esta fase (Taiz e Zeiger, 2004) (Figura 01).

Uma das respostas iniciais contra o déficit hídrico é o fechamento dos estômatos que, reduz a condutância estomática, diminuindo a perda de água e, limitando a difusão de CO₂ para os cloroplastos (Frederick et al., 1989). Há nessas situações um conflito entre a conservação da água pela planta e a taxa de assimilação de CO₂ para produção de carboidratos (Santos e Carlesso, 1998). O fechamento estomático, limitando a difusão de CO₂ para dentro do cloroplasto durante a seca, se dá em resposta ao aumento de ácido abscísico (ABA) (Lima et al., 2002), que acentua ou prolonga o efeito inicial de fechamento do estômato. Este hormônio é produzido nas raízes e armazenado nos cloroplastos das folhas de onde é liberado para o apoplasto (Hartung et al., 1998) e redistribuído, dependendo da permeabilidade das membranas, possibilitando ao fluxo de transpiração transportar parte dele para as células-guarda do estômato. Em condições de déficit hídrico a concentração do ABA aumenta na parte aérea quando comparado com a concentração na parte radicular exposta. Esta resposta foi demonstrado em plantas de *Arabidopsis thaliana* que expressaram a enzima ABA aldeído oxidase AAO3 que catalisa o passo final na biossíntese de ABA, ao longo da vasculatura da folha, tecido da epiderme e células-guarda (Seo et al., 2000; Guzman Gonzalez et al., 2004; Koiwai et al., 2004; Christmann et al., 2005). Assim, após a percepção do déficit hídrico no solo pelas raízes ocorre um acúmulo de ABA e sua redistribuição aos tecidos da planta via xilema, sinalizando quimicamente para o fechamento dos estômatos (Liu et al., 2005). Há a indicação de que não somente o ABA, mas também o pH e a redistribuição iônica desempenhem um importante papel na sinalização entre as raízes e as partes aéreas do vegetal, em condições de seca (Wilkinson e Davies., 2009) (Figura 01).

O fechamento estomático contribui para diminuir a perda de água da folha para a atmosfera, mas, em contrapartida provoca uma diminuição na atividade fotossintética, pois a limitação na assimilação de CO₂ afeta diretamente os processos fotossintéticos. Assim, quando os estômatos se fecham no início do

estresse a eficiência do uso da água pode aumentar, mas quando o estresse se torna mais severo essa eficiência diminui porque as células do mesófilo ficam desidratadas. Com isso a fotossíntese é reduzida e a quantidade de fotoassimilados também, diminuindo a sua exportação das folhas, uma vez que, o transporte do floema depende do turgor e ainda a redução do potencial hídrico no floema durante o estresse hídrico pode diminuir o movimento dos assimilados. Mas a intensidade de translocação permite às plantas mobilizar e utilizar reservas onde elas são necessárias. Essa capacidade de translocação é um fator-chave em quase todos os aspectos da tolerância vegetal à deficiência hídrica (Belin et al., 2010) (Figura 01).

Ainda, quando as plantas estão expostas ao déficit hídrico, acentua-se a produção do hormônio etileno que leva à senescência foliar e conseqüentemente à sua abscisão, diminuindo também a área foliar total da planta, outra resposta de defesa ao estresse imposto (Pierik et al., 2007) (Figura 01).

Algumas espécies, em situações de déficit hídrico, também acumulam solutos compatíveis, ou osmólitos no citoplasma, para diminuir o potencial osmótico e, conseqüentemente, manter o potencial hídrico e o turgor das células próximo ao nível ótimo (Nepomuceno et al., 2001). Este ajuste osmótico, uma das respostas celulares vitais ao déficit hídrico resultante da seca, da salinidade e do frio, permite a manutenção do turgor celular e dos processos que dependem deste turgor, tais como, expansão e crescimento celular e abertura dos estômatos e fotossíntese, além de manter um gradiente de potencial de água favorável à absorção de água pelas raízes.

Estes osmólitos são compatíveis com as membranas celulares e proteínas e quando acumulados em altas concentrações ajustam osmoticamente a célula. Atuam também como moléculas “redox”, pois, consomem equivalentes redutores. Essa condição na desidratação é benéfica, uma vez que, a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) aumenta ao se perturbar as cadeias de transporte de elétrons. Muitos osmólitos também são eficientes removedores de radicais hidroxil contribuindo para a defesa anti oxidação (Santos e Da Costa, 2001; Akashi et al., 2001).

O acúmulo de íons nos vacúolos em resposta ao ajuste osmótico acontece para que estes não entrem em contato com organelas subcelulares ou com enzimas do citosol. Este mecanismo resulta no desequilíbrio osmótico interno (potencial osmótico interno). Dessa forma, para restabelecer o equilíbrio, outros

solutos passam a ser acumulados no citoplasma. Os solutos inorgânicos que participam do ajuste osmótico são principalmente K⁺ e Cl⁻ ou compostos orgânicos, os chamados solutos compatíveis, como a prolina e a glicina betaína e carboidratos, como a sacarose e a trehalose, ou ainda os alcóois pinitol, sorbitol e manitol. Estes solutos, além do ajuste osmótico, também promovem nas plantas, a detoxificação de ROS, estabilizando assim as estruturas quaternárias das proteínas (Ruiz - Lozano, 2003; Chinnusamy et al., 2005).

Os mecanismos de acúmulo de solutos auxiliam no ajuste osmótico permitindo a aclimatação das plantas, facilitando a manutenção do turgor e o alongamento celular, refletindo como um todo, na condutância estomática mais alta sob potenciais hídricos mais baixos. Na desidratação moderada, alcançada quando a deficiência hídrica chega a 23% de água em relação ao peso fresco, os mecanismos de osmoproteção induzem uma “hidratação preferencial das membranas e proteínas” para estabilizá-las durante a desidratação (Hoekstra et al., 2001).

Como no ambiente as plantas estão sob influência de diferentes estresses, Rizhsky et al., (2002) estudaram a combinação dos estresses de seca e de alta temperatura e concluíram que, nesse estado, as plantas de tabaco acumulam altos níveis de sacarose e outros açúcares, mas não acumulam prolina, como observado em plantas submetidas apenas ao déficit hídrico. Isso porque em condições moderadas de estresse hídrico há o acúmulo de prolina e glicina-betaína e, à medida que o estresse torna-se acentuado, há o acúmulo de açúcares como a sacarose. Cabe ressaltar também que a prolina observada na combinação do estresse hídrico e térmico pode ser tóxica para as células porque provavelmente o estresse térmico desequilibra a biossíntese e a degradação de prolina e da enzima D1-pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS, EC 2.7.2.11) (Deuschle et al., 2001; Mani et al., 2002). A degradação da prolina ocorre nas mitocôndrias e o acúmulo de substâncias tóxicas altera a atividade mitocondrial. Rizhsky et al. (2002), baseados nas alterações de transcritos e níveis de metabólitos, identificaram em tabaco as rotas de degradação de amido e a síntese de sacarose durante condições de seca e alta temperatura, e, concluíram que, durante a combinação dos dois estresses, determinados transcritos específicos aos estresses são expressos nos mesmos tecidos que estão expressando os genes do metabolismo dos açúcares.

Como consequência da desidratação, da salinidade, do frio, das

altas temperaturas, entre outros estresses, as plantas sofrem processos de desorganização das membranas, aumento da geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS), inibição de fotossíntese e ainda alteração na aquisição de nutrientes (Hasegawa, et al., 2000). A percepção do sinal de estresse pela planta é mediada por receptores de membrana, por canais de íons, e receptores como as quinases (RLK) ou histidina quinases (HK), que fosforilam reversivelmente as proteínas, refletindo sinergicamente no organismo por ativar grandes e complexas cascatas de sinais moleculares como a do cálcio (Ca^{2+}), da inositol fosfatases (InsP), das espécies reativas ao oxigênio e do ABA. Isso ocorre porque a perda de turgor das células provoca mudanças em canais de transporte ativados por pressão, modificações na conformação ou na justaposição de proteínas sensoriais críticas, embebidas nas membranas celulares e alterações na continuidade entre a parede celular e a membrana celular. Devido à perda de pressão da parede, complexos enzimáticos são ativados e, iniciam uma cascata de eventos moleculares, levando à indução da expressão de várias categorias de genes, envolvidos nos mecanismos de resposta ao déficit hídrico e ativando respostas fisiológicas e morfológicas de defesa (Nepomuceno et al., 2001).

Uma cascata comum de sinalização celular em eucariotos é composta pelas *mitogen-activated protein kinases* (MAPK). O final desta cascata frequentemente transloca o MAPK para o núcleo, que por sua vez fosforila os fatores de transcrição, ativando-os (Triesmann, 1996). Por essa expressão de sinalização de substratos e células-alvo apresentar forte regulação e devido a sua localização, as suas vias podem mediar à sinalização de um estímulo extracelular e trazer respostas específicas, podendo também ser ativado em processo de interação com outras quinases e proteínas G (Robinson e Cobb, 1997), que regulam as MAPKs (Kyriakis e Avruch, 2001). Outra família de quinases encontradas em resposta a desidratação, estresse osmótico ou ABA (Bartels e Sunkar, 2005) são as SNF1/AMP, quinases não fermentadoras de sacarose descobertas em levedura, que controlam genes relacionados ao metabolismo de carboidratos. Para contrabalancear a ação destas quinases, as fosfatases modulam a reversibilidade desse mecanismo fosforegulatório. Pesquisas em *Arabidopsis thaliana* indicam que a fosfatase PP2C age como regulador negativo nos processos bioquímicos regulados pelo ABA em resposta aos estresses abióticos, podendo ainda induzir a produção de ROS nas células-guarda dos estômatos (Murata et al., 2001).

As modificações osmóticas frequentemente alteram a fluidez das membranas, através de mudanças estruturais na conformação dos fosfolipídios, moléculas que também funcionam como mensageiros secundários e são formadas pela ação de fosfolipases (Munnik e Meijer, 2001). Frank et al., (2000) isolaram dois cDNAs de fosfolipase D (PLD) expressos em condições de déficit hídrico que estão envolvidos na resposta precoce à desidratação, através da produção de um segundo mensageiro, o ácido fosfatídico, que amplia o sinal após a percepção do estresse.

Outra importante molécula de sinalização envolvida em diversas funções biológicas é o óxido nítrico (NO). A aplicação exógena desta molécula e de seus doadores em plântulas de trigo e em folhas destacadas melhorou a tolerância das mesmas ao déficit hídrico (Mata e LaMattina, 2001). Essa tolerância é provavelmente devida ao fechamento dos estômatos, à diminuição da taxa de transpiração e da capacidade de induzir a expressão de genes envolvidos na tolerância (Wendehenne et al., 2001).

O cálcio (Ca) também atua nas respostas aos estímulos extracelulares e intracelulares como um mensageiro secundário (Snedden e Fromm, 2001). Em condições de estresse osmótico o aumento do Ca^{2+} citosólico ativa vias de sinais de transdução, descontrola a atividade enzimática, dos canais iônicos e da expressão de genes de resposta (Snedden e Fromm, 2001) para a adaptação ao estresse.

Da mesma forma que o Ca^{2+} e demais mensageiros secundários, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) atua na transdução de sinais em condições de estresse hídrico, aumentando a quantidade celular de ROS e levando à planta a responder ao estresse hídrico e à aclimatação (Kwak et al., 2006). Isto ocorre porque a percepção do estresse hídrico ativa a produção de ABA que leva ao fechamento estomático, diminuindo a transpiração e concomitantemente a diminuição da fotossíntese líquida e a produção global de ROS. Esta limitação de fixação de CO_2 reduz a regeneração do NADP^+ no ciclo de Calvin, resultando na redução ao longo da cadeia de elétrons. Em condições normais de fotossíntese ocorre o direcionamento de elétrons pela reação de Mehler e em condições de déficit hídrico o processo de fotorrespiração predomina e é reforçado especialmente quando a oxigenação máxima da Rubisco (RuBP) é gerada pela limitação de emissões e fixação de CO_2 . Esta predominância chega a ser de 70% do total da produção de H_2O_2 sob condições de déficit hídrico (Shao et al., 2007; Carvalho,

2008).

A fotorrespiração ocorre principalmente em três organelas: mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos e embora produza H_2O_2 ela se torna benéfica durante o estresse hídrico, já que em altas temperaturas e irradiâncias a taxa de carboxilação da RuBP é reduzida, uma vez que, ela passa a ter maior afinidade pelo O_2 ao invés do CO_2 . Como a fotossíntese é acelerada nesse caso, a concentração de CO_2 na folha torna-se limitante e baixa. Essas informações indicam que após o período de estresse, a fotorrespiração teria a função de dissipar o excesso de ATP e $NADPH^+H^+$ produzidos na etapa luminosa da fotossíntese, permitindo à planta a proteção da fotoinibição e uma rápida recuperação (Shao et al., 2007; Carvalho, 2008).

Outra indicação da grande importância da fotorrespiração na tolerância a estresses abióticos está no fato dos peroxissomos atuarem durante os estresses ambientais aumentando o seu número em resposta ao acúmulo de H_2O_2 , o que pode ocorrer durante o estresse hídrico. Porém, quando o estresse hídrico torna-se mais severo, a fitotoxicidade gerada pelo excesso de ROS causa danos severos às membranas e a outros compostos celulares, podendo levar a morte celular. As ROS são encontradas nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos e são responsáveis pela oxidação de múltiplos componentes como proteínas, lipídios, DNA e RNA. A enzima superóxido dismutase (SOD), primeira enzima de defesa contra as ROS, e o ácido ascórbico catalisam o processo de redução de H_2O_2 que ocorre nos tilacóides dos cloroplastos. Estas espécies reativas de oxigênio possuem um forte potencial de reagente oxidante em quase todas as moléculas biológicas, pois, o seu excesso causa danos nas membranas dos tilacóides e no aparato fotossintético e não há reações enzimáticas conhecidas que as eliminem totalmente (Shao et al., 2007) (Carvalho, 2008).

As enzimas ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR) são as duas enzimas antioxidantes de detoxificação das ROS, e catalisam reações em diversos compartimentos celulares. Estudos enzimáticos têm sido realizados em cultivares de vários vegetais tolerantes ao déficit hídrico para compreender esse mecanismo de tolerância. Assim, em folhas de feijão-caupi submetidas ao estresse hídrico foi demonstrado que mudanças sutis ocorrem na distribuição intracelular das isoenzimas APX e GR. Tang et al., (2006) e Lee et al., (2007) em seus trabalhos superexpressaram os genes que codificam para as enzimas APX e CuZnSOD em

plantas de batata, resultando em um aumento da ação de detoxificação de ROS cloroplasmáticas. Estes trabalhos mostram que a expressão combinada de APX e CuZnSOD sob o controle de um promotor estresse-induzido, torna as plantas mais tolerantes ao estresse oxidativo. Além de GR, duas outras enzimas relacionadas ao metabolismo da glutatona, a glutatona S-transferase (GST) e a glutatona peroxidase (GPX), também são induzidas em condições de estresse hídrico.

3.3 MECANISMOS MOLECULARES DESENCADEADOS EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO

Ao longo dos milhões de anos de evolução que levaram ao desenvolvimento de plantas na forma em que se encontram hoje, múltiplos genes de resposta a estresses ambientais foram gerados que são induzidos através da transdução do sinal e da percepção do estresse, ativando no núcleo celular à adaptação da planta de forma direta ou indireta (Tuteja, 2007). No processo de aclimação, durante o déficit hídrico são necessárias algumas proteínas, incluindo proteínas que protegem as estruturas celulares, proteínas de canais, chaperonas moleculares, proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), proteínas e enzimas de síntese de osmoprotetores (solutos compatíveis, açúcares, prolina, etc.) e proteínas regulatórias como os fatores de transcrição, proteínas quinases e fosfatases e enzimas da síntese do hormônio ácido abscísico (Nakashima e Yamaguchi-Shinozaki, 2005).

As proteínas LEA são encontradas em diversos organismos, desde bactérias até plantas superiores e foram inicialmente identificadas e caracterizadas em grandes quantidades em embriões maduros de algodão (Galau et al., 1986). Elas possuem uma composição de aminoácidos que as tornam altamente hidrofílicas (Wise e Tunnacliffe, 2004), e estáveis em condições de calor. Alguns estudos têm se concentrado na determinação bioquímica e nas atividades biofísicas dessas proteínas. Em citros (Hara et al., 2001; Sanchez-Ballesta et al., 2004), *Chlorella* (Honjoh et al., 2000), cevada (Bravo et al., 2003), *A. thaliana* e *Craterostigma plantagineum* (Reyes et al., 2005; Lin e Tomashow, 1992) estas proteínas foram descritas como estabilizadoras das enzimas lactato desidrogenase e malato desidrogenase, durante condições de seca e congelamento, enquanto outros estudos ainda, as indicam como estabilizadoras de catalases (Hara et al., 2001), citrato sintase (Goyal et al., 2005; Pouchkina-Stantcheva et al., 2007), fumarase,

rodanase (Grelet et al., 2005) em diversos organismos sob condições de estresse. Essa família de proteínas é dividida em três superfamílias classificadas por pequenos *motifs* distintos (Wise e Tunnacliffe, 2004) e suas funções vão além de serem chaperonas moleculares, como por exemplo, o gene *RD29* que foi caracterizado por Yamaguchi - Shinozaki e Shinozaki (1993). Este gene codifica uma proteína com um resíduo de cisteína, altamente hidrofílica semelhante à estrutura das proteínas LEA (Baker et al., 1988; Yamaguchi - Shinozaki e Shinozaki, 1993). Dois genes correspondentes ao *rd29* estão localizados em *tandem* em uma região de 8 kb no genoma de *Arabidopsis*, denominados *rd29A* e *rd29B*.

Estudos em *Arabidopsis* demonstraram ainda que a desidrina ERD10, da família das proteínas LEA, possui maior afinidade por água durante a desidratação que outras proteínas hidrofílicas (Bokor et al., 2005; Tompa et al., 2006). Em soja e *Typha latifolia* as proteínas LEA também tem sido apontadas como estabilizadoras de açúcares cuja produção é induzida em resposta à seca (Wolkers et al., 2001; Shih et al., 2004). Essa proteína junto com outra desidrina, a ERD14, se acumula em condições de estresses ambientais como seca, salinidade e frio, e agem protegendo a célula contra os efeitos da desidratação celular por evitar a agregação e inativação de vários substratos celulares (Kovacs et al., 2008).

3.4 FATORES DE TRANSCRIÇÃO

As respostas das plantas às condições diferenciadas de estresses e na combinação destes demonstram a plasticidade do genoma vegetal em responder às mudanças ambientais, e esta plasticidade é dada pela grande rede de fatores de transcrição que respondem às condições às quais as plantas são constantemente submetidas (Rizhsky et al., 2002).

Os fatores de transcrição estão entre os principais mecanismos de controle da expressão de genes que especificamente se ligam a um cis-elementos localizados na região promotora, ao qual se reconhece e liga. Em *Arabidopsis* são conhecidas quatro unidades transcricionais – chamadas de *regulon* que respondem ao déficit hídrico – duas são dependentes de ABA: AREB/ABF (ABA – *Responsive Element Binding protein* / ABA – *responsive element Binding Factor*), MYC (*myelocytomatosis oncogene*) - MYB (*myeloblastosis oncogenese*); e duas são independentes de ABA: DREB (*Dehydration Responsive Element Binding protein*) e

NAC (NAM, ATAF1, 2, e CUC2) - ZF-HD (*Zinc-Finger Homeodomain*) (Nakashima e Yamaguchi-Shinozaki, 2005).

O *regulon* dependente de ABA, AREB/ABF é constituído de uma cascata gênica, onde a região promotora dos genes que a constituem possuem o maior cis-elemento da expressão gênica ABA-dependente: o ABRE (*ABA-responsive elements*: ACGTGG/TC). Uno et al., (2000) analisaram o promotor RD29B, gene de resposta ao frio, em plantas transgênicas de *Arabidopsis* e identificaram dois ABREs que funcionavam como cis-elementos regulatórios na expressão ABA-dependente. Estudaram ainda, três cDNAs que codificam as proteínas AREB – AREB1, AREB2 e AREB3 e todas tinham o *motif* zíper de leucina com um único domínio DNA-ligante. Como resultado, os autores observaram que os genes codificadores das proteínas AREB2 e AREB3 são regulados por ABA. Estudos mostram ainda que, essas duas proteínas atuam como fatores de transcrição e em condições de desidratação, necessitam de ativação pós-transcricional para tornarem-se ativas (Uno et al., 2000).

Em *A. thaliana*, o *regulon* MYC também dependente de ABA é regulado pelos fatores de transcrição MYC e *AtMYC2* (*Arabidopsis thaliana* MYC 2) e o *regulon* MYB por *AtMYB2* (*A. thaliana* MYB2). Neste último foram identificados os elementos cis-ligantes MYCR (*MYC-recognition site*: CANNTG) e MYBR (*MYB-recognition site*: C/TAACNA/G). Esse *regulon* é responsável pela resposta tardia ao estresse, sendo sintetizado principalmente após o acúmulo de ABA (Nakashima e Yamaguchi-Shinozaki, 2005). Além do ABA, outros hormônios vegetais também podem ativar rotas gênicas, como o sistema conservado de ativação de genes de defesa induzido por ácido jasmônico, cujo papel chave é desempenhado pelo fator de transcrição *AtMYC2*, evidenciando o cruzamento das duas rotas de sinalização de estresses abióticos e bióticos (Lorenzo et al., 2004).

Em estudo realizado em *A. thaliana*, Kiyosue et al., (1993) e Nakashima et al., (1997) descobriram que o gene *ERD1* (*early responsive to dehydration stress 1* - resposta precoce a desidratação 1) responde ao déficit hídrico, ao estresse salino e à senescência escuro-induzida, mas não a ABA, através da codificação de uma proteína homóloga da subunidade ligante ao ATP de proteases, Clp ATP dependente. Outros estudos com genes como o *ERD1* demonstraram que estes regulam subunidades de resposta a desidratação e a alta salinidade antes do acúmulo de ABA. Na região promotora dessa família gênica há uma sequência CACTAAATTGTCAC e um *motif* CATGTG NACRS (*NAC recognition*

sequence – sequência de reconhecimento ao NAC) que é reconhecido por fatores de transcrição NAC. Também na região promotora destes genes existe um domínio de ligação a fatores de transcrição de homeodomínios (ZF-HD).

Em *Arabidopsis thaliana*, o *regulon* DREB é ativado pelas proteínas DREB e estas são classificadas em dois grupos, DREB1 (DREB1A, DREB1B, DREB1C, DREB1D, DREB1E e DREB1F) (Liu et al., 1998; Shinwari et al., 1998; Gilmour et al., 1998; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Sakuma et al., 2002; Magome et al., 2004) e DREB2 (DREB2A e DREB2B) (Sakuma et al., 2006b) e todas apresentam um domínio conservado de aproximadamente 60 aminoácidos, denominado domínio AP2, primeiramente identificado na proteína APETALA2 (Okamoto et al., 1997). Os genes *DREB1* localizam-se no cromossomo cinco de *A. thaliana* e são induzidos por estresses de frio, seca e alta salinidade. O cis elemento onde se ligam é também chamado de CRT (*C-repeat e low-temperature-responsive*). Especificamente o gene *DREB1D/CBF4* é induzido por estresse osmótico (Haake et al., 2002; Sakuma et al., 2002), e os genes *DREB1E/DDF2* e *DREB1F/DDF1* induzidos por estresse de alta salinidade (Sakuma et al., 2002; Magome et al., 2004).

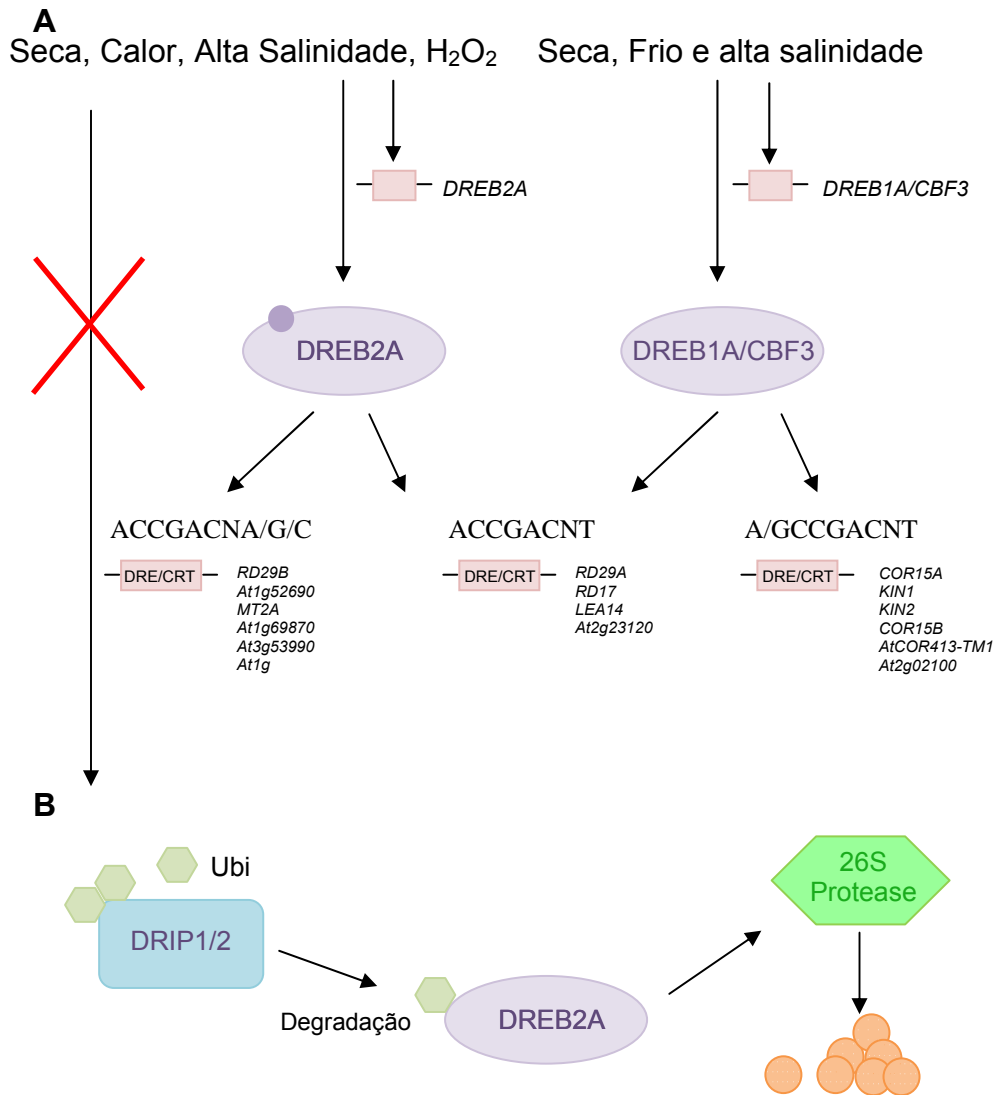
Em várias culturas, como no arroz, em *A. thaliana* e tabaco, a superexpressão do gene *DREB1A* sob controle do promotor constitutivo CaMV 35S, resultou em aumento da tolerância ao estresse de alta salinidade, ao congelamento e à seca, porém, causou retardo de crescimento nas plantas (Yusuke et al., 2006; Kasuga et al., 1999). Em outro trabalho realizado em batata, por Behnam et al., (2006), plantas transgênicas superexpressando o gene *DREB1A* sob controle do promotor estresse induzido *rd29A*, demonstraram um aumento da tolerância à salinidade e crescimento normal, indicando que esse gene pode aumentar a tolerância em espécies poliplóides e diplóides como a *Arabidopsis thaliana*.

Utilizando o gene *DREB1A* de *A. thaliana* em tabaco e trigo, Kasuga et al., (2004) e Pellegrineschi et al., (2002) respectivamente, observaram o aumento da tolerância a seca nessas espécies concluindo que os genes *DREB1A* são conservados no reino vegetal. Em soja, Beneventi (2006), observou que o gene *AtDREB1A* sob o controle do promotor estresse induzido *rd29A* foi inserido e expresso sob seca nesta espécie, induzindo maior tolerância das plantas ao estresse hídrico.

3.4.1 Elemento Ligante de Resposta à Desidratação e ao Calor- *DREB2A* (*Dehydration Responsive Element Binding*)

O gene *DREB2A* pertence à família de fatores de transcrição DREB, que são induzidos sob a ação de estresses ambientais como a seca, a salinidade, o frio e o calor. Especificamente, o gene *DREB2A* é ativado em condições de seca e alta temperatura (Figura 02A). Utilizando *DREB2A* com o promotor constitutivo 35S, inúmeros pesquisadores detectaram, em diferentes espécies vegetais, a indução de genes envolvidos na tolerância ao calor, inclusive de fatores de choque térmico (Sakuma et al., 2006a, 2006b; Qin et al., 2007; Chen et al., 2007).

Figura 2 - A. Esquema de ativação dos genes regulados pelos genes *DREB1A* e *DREB2A* sob condições de seca, calor, alta salinidade, H_2O_2 e frio em *Arabidopsis thaliana*, esses genes são divididos em três grupos: induzidos por *DREB2A*, por *DREB1A* e por ambos. **B.** Esquema do funcionamento das proteínas DRIP1 e DRIP2 na degradação do gene *DREB2A* em condições normais de crescimento da planta.



Fonte: Modelo modificado de Sakuma et al., (2006b) e Qin et al., (2008).

O gene *DREB2A* foi localizado no cromossomo seis de *Arabidopsis thaliana*, sendo que sua superexpressão em plantas transgênicas aumenta a tolerância aos estresses hídrico, salino e térmico. Entretanto, essa proteína necessita de modificações pós-traducionais, como fosforilação, para sua ativação. Essa ativação é provavelmente realizada na região rica em aminoácidos ácidos, na região C-terminal da proteína, mas estudos adicionais precisam ser realizados para

uma melhor elucidação deste mecanismo (Liu et al., 1998) (Sakuma et al., 2006).

A proteína DREB2A possui na região central um domínio entre os aminoácidos 136 e 165, que atua como um domínio regulatório negativo; um domínio de ativação transcricional entre os aminoácidos 254 e a região C-terminal e ainda, na região N-terminal, sinais de localização nuclear (SLN) (Sakuma et al., 2006a, 2006b). Sakuma et al., (2006) obtiveram uma forma constitutivamente ativa do gene *DREB2A* pela deleção de seu domínio regulatório negativo, região rica de serina e treonina, com aproximadamente 30 aminoácidos, adjacente ao domínio de ligação ao DNA ERF/AP2 e denominaram essa construção de *DREB2A CA*. Os estudos de Sakuma et al., (2006) demonstraram que a instabilidade dessa proteína transgênica no núcleo de *A. thaliana*, pode ser revertida em plantas transgênicas superexpressando o transgene *AtDREB2A CA* e fazendo com que este interaja na região promotora DRE de genes de resposta à seca e ao calor.

Qin et al., (2008) trabalhando com proteínas que interagem com *DREB2A* identificaram duas proteínas, DRIP1 e DRIP2 (*Interacting Proteins Function - Proteínas que interagem com DREB2A*), que possuem um sinal de localização nuclear, confirmando a sua atuação no núcleo. Essas proteínas foram alinhadas e uma região C - terminal com alta conservação foi identificada. Essas mesmas proteínas foram encontradas em arroz (*Oryza sativa*) e tomate (*Solanum lycopersicum*). Elas possuem um domínio RING C3H4 essencial para a atividade E3 ligase, indicando que a sua região terminal interage com a proteína DREB2A no processo de ubiquitinação (Moon et al., 2004; Stone et al., 2005). Qin et al., (2008) na continuação de seus estudos sugeriram que as duas proteínas DRIP1 e DRIP2 mediam a proteólise através da degradação da proteína DREB2A, como uma protease 26S, em condições normais de crescimento, já que a planta expressa esse gene em níveis basais. Dessa forma, esse mecanismo minimiza os efeitos negativos da expressão do gene *DREB2A* sobre o crescimento e o desenvolvimento das plantas em condições ótimas. Quando um estresse se inicia é desencadeada a expressão do gene *DREB2A* em maiores níveis e sua degradação pela protease passa a ser inibida diretamente por uma competição de sinalização (Figura 02B). Dessa forma, a planta passa a ativar os genes da cascata de resposta ao estresse (Qin et al., 2008).

Análises de microarranjos utilizando RNA de *A. thaliana* transformada com *DREB2A CA* indicaram 21 genes *up*-regulados, dentre estes, 12

foram *up*-regulados sob condições de seca e, nove genes foram *up*-regulados em condições de salinidade e calor (Sakuma et al., 2006b). Os 12 genes com expressão induzida detectada em condições de déficit hídrico mostraram em seus promotores, a sequência core DRE. Esta sequência core DRE encontrada nos genes *DREB* indicam que as proteínas DREB1A e DREB2A possuem uma rota de ativação comum, respondendo ao déficit hídrico e a salinidade. Estudos da sequência DRE indicam que a proteína DREB1A tem alta afinidade pela sequência A/GCCGACNT. Outros estudos mostram que 75% dos genes *up*-regulados por *DREB1A* possuem essa sequência na região promotora e apenas 36% dos genes *up*-regulados por *DREB2A* a possuem. O último nucleotídeo dessa sequência (T) influencia na afinidade da proteína DREB1A pela região promotora de seus genes, mas substituições desses nucleotídeos na região promotora dos genes da cascata *DREB2A* não afetam a sua afinidade. De cada 11 sequências DRE de genes da cascata *DREB2A*, 10 continham ACCGAC e uma continha GCCGAC, indicando a maior afinidade do gene pela região DRE que possui como primeiro nucleotídeo a adenina. Essas pequenas diferenças nas regiões DRE dos promotores dos genes *DREB* demonstram a especificidade dos genes e as diferenças nas rotas das proteínas DREB1A e DREB2A (Sakuma et al., 2006).

Uma confirmação de que o gene *AtDREB2A* está envolvido no estresse térmico provém dos resultados de Schramm et al., (2008). Estudando *A. thaliana* os autores concluíram que o fator de transcrição de resposta a choque térmico, HSFA3, era regulado por *AtDREB2A* e que em linhagens silenciadas, por esse gene, houve uma redução de 40 a 60% da termotolerância. O HSFA3 é capaz de interagir especificamente com o grupo de fatores de transcrição HSFA1 (Lohmann et al., 2004) e HSFA2 (Nishizawa et al., 2006; Schramm et al., 2006), sugerindo um modelo de resposta a estresse térmico em que o fator HSFA3 em cooperação com HSFA2 aumentam a termotolerância precoce, ao atuar no fator de transcrição HSFA1, que se liga à região promotora dos genes que transcrevem as proteínas de choque térmico. Na fase tardia de termotolerância, o HSFA3 parece ter importância fundamental na estabilização da termotolerância, possivelmente por formar hetero-oligômeros com HSFs A1a, A1b e A2. Ainda, análises funcionais de padrões de expressão dos 21 HSFs de *A. thaliana* (Kotak et al., 2007) indicam funções integradas em diferentes rotas de sinalização de respostas a estresses bióticos e abióticos, sugerindo que juntos com outros fatores de transcrição (HSFs -

Heat Shock Factors) formam complexas rotas metabólicas essenciais para que as plantas suportem mais rapidamente mudanças ambientais resultantes dos estresses.

Dessa maneira, tem-se obtido plantas transgênicas mais tolerantes a seca e ao calor quando inserido o gene *DREB2A*. Plantas de *A. thaliana*, após a inserção do gene *ZmDREB2A* (homólogo de *DREB2A* em *Zea mays*) sob controle do promotor CaMV 35S resultou em um aumento da tolerância ao déficit hídrico e térmico. Análises de microarranjos mostraram nestes eventos a superexpressão de genes normalmente induzidos por estresse, como proteínas LEA, proteínas de choque térmico, enzimas de detoxificação e maturação de semente (Qin et al., 2007). Outro estudo realizado com gene *DREB2* homólogo foi realizado por Dubouzet et al., (2003) que inseriram e superexpressaram em arroz, o gene *OsDREB2A* resultando em tolerância à desidratação e a alta salinidade.

Em girassol, *Helianthus annuus* L., o gene *HaDREB2* (homólogo de *DREB2A* em *Helianthus annuus*) e *HaHSFA9* foram conjuntamente expressos em sementes, demonstrando estarem presentes quando as plantas possuíram uma maior longevidade, fato acompanhado pelo sutil aumento no acúmulo de pequenas proteínas de choque térmico (sHSPs, *small Heat Shock Proteins*) indicando tolerância a seca e ao estresse térmico (Almogueva et al., 2009).

Estudos realizados por Terashima e Takumi (2009) em trigo, *Triticum* spp., mostraram que o gene *WDREB2* (homólogo de *DREB2A* em trigo) ativa os genes *downstream* *Cor/Lea* e possui um papel importante nas respostas a estresses abióticos. O trigo é uma espécie poliplóide, e este estudo teve como objetivo compreender o *splicing* alternativo do gene *WDREB2*, que é regulado de forma pós-transcricional e está presente também em plantas com diferentes ploidias. Eles observaram que, em trigos diplóides, o *splicing* alternativo produzia formas funcionais e formas não funcionais, e a forma não funcional diminuía gradativamente em resposta ao déficit hídrico. Este estudo foi baseado na pesquisa realizada por Egawa et al., (2006) que estudaram o *splicing* alternativo do gene *WDREB2* nas formas *WDREB2* alfa, *WDREB* beta e *WDREB2* gama, indicando que a beta permaneceu constante nas 24h de condições de estresse salino, enquanto que, as outras duas formas do gene apresentaram aumentos transitórios. Quando o tratamento por frio foi analisado, este induziu níveis elevados das três diferentes isoformas do gene sugerindo que em condições de estresse hídrico, salino e frio o

gene *WDREB2* e suas isoformas são controladas pelo nível de transcrição e pelo *splicing* alternativo (Egawa et al., 2006). Provavelmente, a alopoliploidização em plantas hexaplóides ocorrida durante a evolução do trigo inibiu o eficiente *splicing* alternativo. Kobayashi et al., (2007) também geraram plantas transgênicas de tabaco super-expressando o gene *WDREB2* para provar o papel desse gene em resposta ao déficit hídrico e na transativação de genes *Cor/LEA*, resultando na tolerância a múltiplos estresses abióticos.

Outros pesquisadores ainda, trabalhando com crisântemo (*Dendrathera vestitum*) isolaram o gene homólogo de *DREB*, *DvDREB2A* e, após realizar o alinhamento de sequências múltiplas, o classificaram como um membro da subfamília DREB2 da família DREB. Para provar este conceito, os pesquisadores realizaram um experimento de levedura híbrida de proteínas e fizeram a ligação desse gene com a região DRE de um promotor. Análises de PCR quantitativo mostraram que o nível do gene *DvDREB2A* variou significativamente quando a planta foi afetada pelo calor, frio, seca, salinidade e tratamento com ABA (Liu et al., 2008).

Vários outros estudos foram realizados utilizando genes homólogos do gene *AtDREB2A* indicando a necessidade de modificação pós-traducional para a sua ativação e, conseqüentemente da indução da tolerância a diversos estresses ambientais, como exemplo, cita-se o gene *PgDREB2A* de *Pennisetum glaucum* que responde ao frio, a seca e a salinidade, depois de sua desfosforilação. Este estudo realizado *in vitro* indicou que esse gene é transcrito e traduzido em uma fosfoproteína que possui um resíduo de treonina (s), indicando possivelmente a necessidade de modificação pós-traducional (Agarwal et al., 2007).

O gene *GmDREB2*, homólogo de DREB em soja, foi inserido em plantas de tabaco e estudos de expressão gênica, sob condições de estresses, sugeriram que este gene sobrepõe as rotas ABA-dependente e ABA-independente, podendo participar de ambas simultaneamente. A superexpressão do gene *GmDREB2* ativou a expressão de genes para a biossíntese da prolina e também de outros genes que resultaram em maior tolerância aos estresses de seca e salinidade (Chen et al., 2007).

3.5 MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO EM PLANTAS

A biotecnologia utiliza os conhecimentos sobre os processos biológicos e sobre as propriedades dos seres vivos para resolver problemas e criar produtos de utilidade. Sua aplicação no melhoramento vegetal é uma ferramenta com potencial para o aumento de produtividade e qualidade dos produtos. Em muitas situações pode reduzir os custos de produção, diminuindo o esforço do produtor, podendo diminuir a necessidade de extensão das áreas agrícolas, além de possibilitar a prática dos sistemas produtivos ambientalmente mais sustentáveis (Peña et al., 1995).

O uso da biotecnologia em conjunto com a engenharia genética baseia-se na transmissão, integração e expressão de genes heterólogos ou homólogos de interesse definidos pela seleção *in vitro*. A transformação de plantas, uma técnica da engenharia genética, foi um dos maiores avanços ligados à tecnologia agrícola nos últimos anos, pois, possibilitou a introdução de novas características às plantas cultivadas como resistências a herbicidas, insetos ou patógenos e a melhora na qualidade dos alimentos. A biotecnologia quebrou a barreira entre espécies permitindo trazer caracteres de interesse de uma espécie para outra. Além da sua utilização na ciência aplicada, ela gera ciência básica permitindo estudos de modelos de processos celulares básicos, aumentando assim nossas informações fundamentais necessárias para a compreensão completa do metabolismo vegetal (Úbeda e Haig, 2005).

A transferência de genes entre plantas surge para acelerar as etapas do melhoramento clássico que desenvolve cultivares superiores para a característica de interesse através de cruzamentos, obtenção de populações segregantes e avaliações da característica, entre outros métodos. Estes cruzamentos podem levar anos e muitas vezes este procedimento é dificultado pela incompatibilidade sexual dos organismos. Por estes motivos, a transformação de plantas acelerou esse processo e tornou possível a introdução controlada e a integração de ácidos nucléicos em um genoma receptor, excluindo-se a introdução por fecundação. Isso é potencializado pela enorme variabilidade existente na natureza, fornecendo fonte de genes para a criação de novas cultivares (Úbeda e Haig, 2005).

Para que novas características agronômicas sejam introduzidas em

plantas ou organismos GMs são necessários estudos prévios dos genótipos responsáveis por essas características. Depois dessa descoberta deve-se testar a função gênica ou partes dos genes de interesse e a modificação de sua expressão (superexpressão ou o silenciamento gênico) para então isolá-los e inseri-los nos indivíduos (Mason et al., 2002). A transferência gênica pode ser realizada através de duas estratégias de transformação: direta, via eletroporação de protoplastos, transformação mediada por PEG (polietilenoglicol), bombardeamento de partículas, macro e microinjeção, utilização de raios laser, microfibras de carboneto de silício e ultra-som – ou indireta - via o uso de *Agrobacterium* sp. Os processos de transformação são escolhidos especificamente para cada espécie e cultivar, dependendo principalmente de protocolos que aumentem a eficiência da transformação (Southgate et al., 1998).

Dentre as metodologias de transformação direta está a biobalística, que consiste em um processo físico de aceleração de micropartículas desenvolvido por John Sanford em 1987, e se baseia na introdução do DNA de interesse, envolto em pequenas partículas de metal (ouro ou tungstênio), em células e tecidos. As partículas são aceleradas em direção ao tecido alvo, através de equipamentos diversos: cartuchos com pólvoras, pressão de gás ou descarga elétrica e, atravessam a parede celular e a membrana plasmática. Quando as partículas recobertas de DNA entram em contato com as organelas celulares e com o núcleo da célula vegetal, o líquido celular carrega as partículas deixando livre o material genético. O DNA exógeno pode então ser incorporado, ao acaso, aos cromossomos tornando-se parte do material genético da célula receptora.

Neste enfoque, vários estudos têm sido realizados na utilização desse processo em dicotiledôneas, como no caso da soja. Rech et al., (2008) desenvolveram um protocolo com alta eficiência de transformação via biobalística, combinando com a resistência ao herbicida imazapir, que age como agente de seleção na região meristemática dos múltiplos brotos a partir dos eixos embrionários de sementes maduras.

Outra técnica de transformação direta, a via protoplastos, consiste na retirada da parede celular das células vegetais (Evans e Sharp, 1986) e na incubação dessas células em soluções que contêm os genes de interesse a serem incorporados. A transferência dos genes para a célula pode ser via eletroporação, pela produção de poros na membrana quando a solução é colocada sob impulsos

elétricos (Fromm et al., 1985) ou quimicamente, através de mudança da permeabilidade da membrana. Outra técnica que utiliza protoplastos é a transformação por polietilenoglicol (PEG) que combina PEG com Ca^{+2} , Mg^{+2} e pH alcalino, promovendo a ligação do DNA exógeno à superfície dos protoplastos. O DNA é absorvido pela célula por endocitose. Outra função do PEG é a proteção do DNA contra a atividade das nucleases (Finer et al., 1996). Essa técnica tem algumas desvantagens como a baixa frequência de transformação, de aproximadamente 1%, sendo restrita a algumas espécies (Raybould e Gray, 1993). Esta metodologia demanda ainda um sistema eficiente de regeneração de plantas completas a partir de protoplastos, atualmente restrito a poucas espécies.

A técnica de microinjeção foi desenvolvida principalmente para a transformação gênica em animais e posteriormente ela foi adaptada para a transformação de plantas. Esta metodologia consiste na microinjeção do DNA exógeno diretamente no núcleo de protoplastos ou em inflorescências. Mesmo sendo uma técnica trabalhosa, Neuhaus (1995) obteve resultados positivos na transformação gênica de células vegetais utilizando esta técnica.

A transformação via tubo polínico vem sendo aplicada a algumas espécies vegetais. Essa tecnologia utilizada pela primeira vez em algodoeiro foi divulgada por Zhou et al., (1983) e consistiu na aplicação de uma solução de DNA de interesse na parte superior da maçã após ter sido polinizada. O DNA exógeno pode alcançar o ovário através da passagem deixada pelo tubo polínico e integrar-se às células zigóticas já fertilizadas, mas não divididas.

A transformação de forma indireta, mediada por vetores biológicos consiste na capacidade natural que as agrobactérias, patógenos do solo, possuem de introduzir o seu DNA em plantas hospedeiras, que é incorporado e passa a ser expresso como parte do genoma vegetal (Schläppi e Hohn, 1992). Na transformação vegetal, o processo é praticamente o mesmo que ocorre naturalmente possuindo baixa complexidade do padrão de integração e alta probabilidade dessa integração ser de uma ou poucas cópias, além da não fragmentação e recombinação do transgene (Fisk & Dandekar, 1993). Além disso, o sistema é simples, de baixo custo e, em muitos casos, eficiente. Assim, para que o processo de transferência do DNA exógeno ocorra, algumas regiões do plasmídeo de transferência (pTi) são importantes: a região de virulência *vir* (*regulon* de 6 a 8 operons de genes envolvidos na síntese de proteínas responsáveis pela transferência da região T); a região T (a

região de transferência TRA – um segmento de DNA que é transferido para a planta) e a região de replicação ORI+INC (Santarém, 2000). Algumas dicotiledôneas e a maioria das monocotiledôneas e gimnospermas não são suscetíveis, ou apresentam pouca suscetibilidade à infecção pela *Agrobacterium tumefaciens* (Potrikus, 1990).

De modo geral, no processo de transformação vegetal, via *Agrobacterium*, a engenharia genética foi utilizada na retirada dos oncogenes da região T (T-DNA), tornando a bactéria desarmada, e substituindo essa região pela sequência do gene de interesse, que é transferido dos vetores de transformação para a *Agrobacterium* por conjugação triparental, eletroporação ou choque térmico. Todos os métodos de transformação devem conter etapas de descontaminação do tecido a ser transformado, etapas de seleção de células transformadas e regeneração do tecido (Santarém, 2000).

3.6 MÉTODOS DE ANÁLISE MOLECULAR

Alguns métodos são de suma importância na análise de um evento de transformação de uma planta GM. Nestas etapas, verifica-se principalmente se o transgene foi inserido e integrado ao genoma, quantas cópias e inserções estão presentes, e se o transgene está sendo expresso.

As análises envolvidas na integridade, inserção e segregação do gene, são realizadas principalmente por PCR convencional, *Southern blot*, e a quantificação de número de cópias, realizada via PCR quantitativo. A expressão do transgene de interesse e outros genes relacionados pode ser realizados por técnicas como *Northern blotting*, microarranjos de DNA, quantificação relativa via PCR quantitativo, dentre outras metodologias. Para se ter certeza que o transgene foi transcrito, traduzido de maneira correta, e que ativou rotas metabólicas de interesse, é necessário executar análises protéicas, como imunoblottings, gel de eletroforese bidimensional, ou ainda análises de metaboloma.

Em alguns estudos tem-se relatado a importância da integração do transgene na primeira geração (T_0), e dados mostram que quando um ou dois genes são integrados no genoma haplóide, níveis maiores de expressão do transgene inserido são detectados. Por outro lado, um número elevado de cópias do transgene inserido pode resultar no silenciamento do mesmo e conseqüentemente na não expressão gênica. (Flavell, 1994; Vaucheret et al., 1998). Habitualmente após a

quantificação do número de cópias, a próxima etapa é avançar gerações dos eventos mais promissores, verificando sua estabilidade genética, para realizar outras análises de interesse, como quantificações gênicas em condições de estresses ambientais, parâmetros fisiológicos, agrônômicos, entre outros (Mason et al., 2002).

3.6.1 *Southern Blot*

A técnica de *Southern blot* foi desenvolvida pelo pesquisador britânico Edwin M. Southern, em 1975, que desenvolveu a metodologia de transferência de nucleotídeo de finas tiras de géis de eletroforese para membranas de celulose (Southern, 1975). Este protocolo vem sendo utilizado desde então em trabalhos de caracterização de números de cópias inseridas em plantas transgênicas, como mostrado por Hernandez-Garcia et al. (2009).

3.6.2 PCR Quantitativo (qPCR)

O PCR quantitativo também chamado de PCR em tempo real é uma metodologia capaz de quantificar os ácidos nucléicos, no momento em que estão sendo produzidos, ou seja, amplificados, a cada ciclo do PCR, dispensando análises pós amplificação, reduzindo riscos de contaminação e erros decorrentes de análises “*end point*”, permitindo assim, a quantificação exata do número de cópias de moléculas de DNA em uma amostra testada.

Em uma etapa anterior a reação de PCR quantitativo utiliza-se uma transcriptase reversa (enzima que faz a polimerização de moléculas de DNA complementar usando como molde moléculas de RNA). Normalmente é utilizada a transcriptase, MMLV-RT, isolada a partir de murinos ou a AMV-RT isolada de aves. A utilização dessa metodologia na análise de expressão gênica juntamente com a Transcriptase Reversa (RT-PCR) permitiu a quantificação de quantidades mínimas de ácidos nucléicos (Heid et al., 1996).

Muitos químicos podem ser utilizados na detecção dos produtos amplificados. Assim, em toda a reação de PCR quantitativo, utilizando o sistema de detecção *TaqMan*, alguns princípios básicos devem ser observados: a atividade exonuclease 5'-3' da *Taq* DNA polimerase (Holland et al., 1991) e a construção de oligonucleotídeos utilizados como sondas que só emitem fluorescência quando

clivados, baseado no princípio de transferência de energia por ressonância (Stryer, 1978; Cardullo et al., 1998).

A metodologia *TaqMan* baseia-se na hibridização de uma sonda de sequência complementar ao centro da molécula alvo. Essa sonda possui em uma de suas extremidades um repórter *dye* (terminal 5') e na outra extremidade absorvendo a fluorescência emitida pelo *dye* repórter, o *dye* quencher (terminal 3'). Quando ocorre a hibridização da sonda, a atividade exonuclease da *Taq* DNA polimerase cliva a sonda, assim, a fluorescência emitida pelo *dye* repórter não é mais absorvida pelo *dye* quencher. Esta a fluorescência do reporter segue aumentando e é captada por um equipamento de PCR apropriado (Giulietti et al., 2001).

Além da metodologia *TaqMan*, as reações de PCR quantitativo podem ser realizadas utilizando o sistema de detecção SybrGreen, um *dye* que se intercala em pequenas regiões das moléculas de DNA fita dupla e aumentam a emissão de fluorescência de acordo com a quantidade de moléculas geradas durante a amplificação. Esta fluorescência é captada por um sistema óptico, quantificando indiretamente as moléculas geradas. Existe ainda sistemas de detecção mais sofisticados como *molecular beacons*, *Scorpions*, e sondas de hibridização (Giulietti et al., 2001).

Na metodologia *TaqMan*, os valores da clivagem da sonda durante o processo de amplificação são expressos pelo valor de ΔRn , conforme equação descrita abaixo (Heid et al., 1996; Gibson et al., 1996):

$$\Delta Rn = RN^+ - RN^-$$

onde, RN^+ é a emissão da fluorescência em cada ponto de captação;

RN^- é a emissão de fluorescência no *baseline* (*background*).

Na fase exponencial da reação, a intensidade de fluorescência é determinada em todas as amostras e os resultados podem ser comparados, gerando a chamada magnitude de fluorescência (*threshold*), produzida em cada reação de amplificação durante os ciclos de PCR. Graficamente o *threshold* é a linha cuja intersecção com a curva de amplificação define o C_t calculado a partir do ciclo 3 ao ciclo 15. O C_t define a quantidade de ciclos de PCR requeridos para que amostra emita fluorescência suficiente para alcançar magnitude e ser detectada pelo aparelho. O valor de C_t diminui linearmente com o aumento da quantidade de moléculas alvo amplificada (Giulietti et al., 2001).

Normalmente, a análise do gene alvo na quantificação relativa e absoluta pode ser realizada pelo método da curva padrão ou por métodos de comparação entre Cts. A quantificação relativa resulta na relação entre a expressão do gene alvo em um determinado tratamento em relação ao controle (base dos dados comparativos). Essa quantificação é realizada pela diferença entre os valores de Cts resultantes das amplificações realizadas.

Uma reação de PCR quantitativo confiável exige a correção de variações experimentais, resultantes das quantidades de RNA e da eficiência da transcrição reversa. Essas diferenças podem resultar em quantidades de DNA diferentes das quantidades iniciais de RNA (Freeman et al., 1999). O método mais aceitável para corrigir essas variações é o uso de genes constitutivos na normalização dos dados. Esses genes constitutivos precisam ser expressos em níveis constantes entre os diferentes tecidos de um organismo, em todas as fases de desenvolvimento, e não ter sua expressão alterada por tratamentos experimentais (Giulietti et al., 2001).

Dentre os métodos que utilizam os valores de Ct para cálculo da expressão relativa está o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que postula que a eficiência de amplificação do gene alvo e da referência devem ser semelhantes. A curva padrão é utilizada quando a eficiência dos dois *amplicons* (eficiência de amplificação de um determinado fragmento) não são iguais (Livak e Schmittgen, 2001).

A eficiência de amplificação é calculada pelo modo como ΔCt varia com o modelo de diluição. Esses valores são plotados em um gráfico e o *slope* da reação utilizado no cálculo da eficiência:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

onde o *slope* representa a inclinação da reta.

Depois da eficiência calculada, deve-se diminuir a diferença entre o Ct do gene alvo pelo Ct do gene referência da amostra, normalizando-o:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{ref}}$$

Com os dados já normalizados, calcula-se a expressão do gene pela diferença do ΔCt do tratamento pelo seu respectivo calibrador (controle):

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{trat}} - \Delta Ct_{\text{cal}}$$

Esse valor é então substituído na fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e após análises estatísticas, o valor de quantificação relativa do gene de interesse é obtido.

Além deste método, que não corrige a eficiência, os níveis de

expressão de um gene alvo de interesse podem ser determinados com base na fórmula: Expressão = $(E_{\text{alvo}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{alvo}} (\text{média do calibrador} - \text{média da amostra})}$

$$(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{ref}} (\text{média do calibrador} - \text{média da amostra})}$$

onde, E_{alvo} é a eficiência do gene alvo (transgene) e;

E_{ref} é a eficiência do gene referência.

Neste caso leva-se em consideração tanto a eficiência do alvo como a do normalizador, dessa forma os resultados de expressão de cada gene são dados de forma corrigida (Pfall 2001).

O método $2^{-\Delta\text{Ct}}/2$, derivado do método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, é apropriado para calcular o número de cópias do gene alvo no tratamento, onde é utilizado como calibrador um gene da própria amostra. E o valor do ΔCt é substituído na fórmula resultando na quantificação gênica (Livak e Schmittgen, 2001).

4 ARTIGO

“Obtenção e caracterização de plantas de soja (*Glycine max* L. Merrill) geneticamente modificadas com o gene *AtDREB2A* visando tolerância à seca”

Artigo a ser submetido à revista: Theoretical and Applied Genetics

1 INTRODUÇÃO

A soja é uma leguminosa de grande importância para a economia brasileira, tornando o país o segundo maior produtor mundial do grão. Dados observados na safra 2009/10 preveem uma produção de 67,39 milhões de toneladas do grão. Esta alta produtividade na última safra deve-se às condições climáticas favoráveis durante o desenvolvimento das culturas aliada a maior utilização da biotecnologia (CONAB, 2010).

A soja é a responsável pela movimentação de 15,011 milhões de dólares nas exportações brasileiras no ano de 2010 (ABIOVE, 2010). Porém, esta alta arrecadação é influenciada por fatores abióticos e bióticos que diminuem a produtividade. Dentre os fatores abióticos, a seca é a responsável por perdas que podem alcançar até 50% da produtividade da maioria das culturas (Boyer, 1982; Bray et al., 2000). Financeiramente, nos últimos anos, os dados mostram prejuízos de mais de US\$ 4 bilhões, decorrente desta condição ambiental adversa, como observado nas safras, 2003/04 e 2004/05, que provocaram respectivamente perdas de US\$1,8 bilhão e US\$2,32 bilhões (IBGE, 2005).

Uma das estratégias utilizadas na redução dos danos decorrentes da seca é o uso da biotecnologia na obtenção de cultivares mais tolerantes aos estresses. Dessa maneira, um grupo de pesquisadores do JIRCAS (*Japan International Research Center for Agricultural Sciences*) identificou, caracterizou e isolou de *Arabidopsis thaliana*, uma família de fatores de transcrição chamada DREB (*Dehydration Responsive Element Binding*) responsável pelo aumento da tolerância a estresses abióticos, como a deficiência hídrica (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

O fator de transcrição DREB1A de *Arabidopsis thaliana*, de resposta à seca, frio e salinidade, foi inserido em soja por Beneventi (2006) e sua expressão

gênica, e as respostas anatômicas, morfológicas e agronômicas caracterizados por Polizel (2007) e Salinet (2008), em condições experimentais de deficiência hídrica, resultando em dados que indicaram tolerância à seca aumentada nessas plantas.

Em situações de campo, no entanto, os estresses abióticos como seca e calor se interligam, e por possuírem respostas celulares similares observam-se rotas em comum, desencadeadas por fatores de transcrição como o DREB2A, responsável pela tolerância à seca, ao calor e à alta salinidade.

Estudos realizados com genes homólogos de *AtDREB2A*, em milho (Qin et al., 2007), arroz (Dubouzet et al., 2003), girassol (Almogueva et al., 2009), trigo (Terashima e Takumi, 2009) e crisântemo (Liu et al., 2008) demonstraram que as plantas suprerexpressando esses genes aumentaram a tolerância à seca por expressarem genes de resposta a seca e ao calor.

O objetivo desse trabalho foi inserir o gene que transcreve o fator de transcrição DREB2A, isolado de *A. thaliana*, em soja, por meio de biobalística, e após a obtenção de eventos GMs, analisar a expressão gênica do transgene, em condições de seca, em folhas e raízes, por PCR quantitativo, e caracterizar o número de cópias inseridas do transgene no genoma da soja. Esses resultados auxiliarão na seleção futura de um evento “elite”, a ser utilizado no programa de melhoramento vegetal da soja com o objetivo de se desenvolver cultivares comerciais mais tolerante à seca.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 DESENHO DE PRIMERS E ÁRVORE FILOGENÉTICA

Análises *in silico*, utilizando a ferramenta Blast (*National Center for Biotechnology Information*, www.ncbi.nlm.nih.gov), foram realizadas para verificar a especificidade do transgene *AtDREB2A*, visando assegurar que quaisquer diferenças observadas na expressão gênica e na quantificação do número de cópias não resultariam da expressão de genes *DREB* endógenos da própria soja.

Assim, sequências depositadas no NCBI dos genes *DREBs*, em diversas espécies vegetais foram alinhadas globalmente através do programa Clustal X e uma árvore filogenética foi desenhada com o auxílio do programa MEGA 4.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*).

2.2 OBTENÇÃO DE PLANTAS DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADAS COM O GENE *AtDREB2A*, POR BIOBALÍSTICA

2.2.1 Biobalística

Embriões da cultivar de soja BR16, sensível à seca (Oya et al., 2004) foram co-transformados por biobalística, com as construções gênicas *rd29A:AtDREB2A CA* e *ahas:AHAS* conforme Aragão et al. (2002) e Rech et al. (2008). A construção gênica *rd29A:AtDREB2A CA* contém o promotor estresse induzido *rd29A* e a região condante do gene *AtDREB2A* em sua forma constitutivamente ativa (CA), e a construção *ahas:AHAS* o gene *ahas*, que funciona como gene de seleção, pois confere tolerância ao herbicida imazapir, da classe das imidazolinonas.

Inicialmente, foi realizada a assepsia das sementes, deixando-as em água por 16 h “*over night*”. A seguir, com o auxílio de pinças e bisturis estéreis os embriões foram excisados e depositados em placas de Petri. Os primórdios foliares foram retirados expondo-se a região meristemática. Em seguida, foram colocados em papel de filtro para secagem em fluxo laminar e em placas contendo meio, 3% sacarose e 0,8% *phytagel*, pH 5,7. Os embriões foram posicionados em um círculo de 16 mm de diâmetro no centro da placa de modo que o meristema apical ficasse direcionado para cima.

O DNA exógeno utilizado no bombardeamento consistiu-se em 6 µg das construções gênicas *rd29A:AtDREB2A* e *ahas:AHAS*, precipitado em micropartículas de tungstênio com auxílio de espermidina (100 mM) e cloreto de cálcio (CaCl₂, 2,5 M). Alíquotas do DNA foram distribuídas em membranas carregadas de Kapton e a região meristemática dos embriões foi co-transformada. Os disparos foram efetuados seguindo o protocolo desenvolvido por Aragão et al. (2002) e Rech et al. (2008).

Após a co-transformação, os embriões foram transferidos para placas de vidro contendo meio MS suplementado com BAP 5 mg/L) 3% sacarose, 0,6% ágar, pH 5,7 e incubados por um período de aproximadamente 18 h, a 28°C e ao abrigo da luz, para a indução do multibrotamento. Após este período, os embriões foram transferidos para meio seletivo (MS 3% sacarose, 0,15 µM Imazapir, 0,8% ágar, vitamina B5, pH 5,7), permanecendo por aproximadamente 45 dias em

câmara climatizada, com 16 h de fotoperíodo e luminosidade de $50 \mu\text{mol s}^{-1}$, a 25°C e a 60% umidade. Finalmente, foram transferidos para copos contendo areia: vermiculita (1:1), irrigados com solução nutritiva (Hewitt, 1963) e cobertos por sacos plásticos para aclimação.

2.2.2 Extração de DNA e Análise Via PCR Convencional

Amostras de folha das plantas de soja transformadas foram coletadas para extração de DNA total, conforme protocolo de Doyle e Doyle (1987), com modificações.

A confirmação dos eventos positivos foi realizada via PCR convencional utilizando-se pares de *primers* específicos para os genes *AtDREB2A* e *AHAS* como apresentado na Tabela 01.

Tabela 1 - Sequências dos *primers* usados na amplificação por PCR para confirmação dos eventos positivos e tamanho do fragmento amplificado.

Gene	Primer Foward	Primer Reverse	Fragmentos
<i>AHAS</i>	5' ACTAGAGATTCCAGCGTCAC 3'	5' GTGGCTATACAGATACCTGG 3'	686 pb
<i>AtDREB2ANostProx e 29AP5H</i>	5' GTTTGAACGATCGGGGAAAT 3'	5' GGGAAGCTTGCCATAGATGCAATTCAATCAAAC 3'	1975 pb

A reação de PCR foi composta de $5 \mu\text{M}$ de cada *primer* F e R, $2,5\text{mM}$ dNTP's (Invitrogen), 50mM cloreto de magnésio (MgCl_2) (Sigma), $2,5 \mu\text{L}$ de tampão 10X, 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 60ng de DNA, completando o volume final de $25 \mu\text{L}$ com água ultrapura. As amplificações foram realizadas em termociclador Perkin Elmer 9600, com denaturação inicial de 95°C por 5 min, seguidas de 35 ciclos de 95°C por 1min, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min e 72°C por 7 min.

Os produtos de amplificação das reações foram submetidos a eletroforese e visualizados em transluminador UV. Os eventos positivos foram transferidos para vasos, em casa de vegetação, para realização de experimentos posteriores e avanço de gerações (multiplicação de sementes).

Para análise de quimerização nos eventos positivos selecionados (P 1397 e P 2193) na geração T_0 , foram coletados fragmentos de folhas de

diferentes partes da planta e uma reação de PCR foi realizada como descrito acima. Análises de segregação do transgene foram realizadas nos dois eventos selecionados em diferentes gerações: P 1397 (geração T₁) e P 2193 (geração T₁ e T₂).

2.3 ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DO TRANSGENE NO GENOMA DA SOJA VIA PCR QUANTITATIVO

A técnica de PCR quantitativo foi utilizada ainda na determinação do número de cópias inseridas do cassete transgênico *rd29A:AtDREB2A* no genoma da soja. Plantas positivas na geração T₀ dos eventos P 1397, P 7186, P 7413, P 2193, P 7195, P 7417, P 7212, P 7418, P 7231, P 7430, P 7256, P 7374, P 7431, P 7174, P 7393, P 7531 e na geração T₁ de duas plantas do evento P 1397 e do evento P 2193 foram analisadas.

Nesta análise para número de cópias inseridas, o gene endógeno da lectina (*GmLec*, Acesso No. K00821) foi utilizado como gene referência para a normalização por ser espécie específico e apresentar apenas uma cópia no genoma haplóide de soja (Meyer, 1994). Os pares de *primers* e a sonda específicos para os gene alvo *AtDREB2A* e gene de referência *GmLec* foram desenhados com o programa *Primer Express 2.0* (*Applied Biosystems*) (Tabela 02).

Tabela 2 - Sequências de *primers* e sondas dos genes *AtDREB2A* e *GmLec*, usados para o cálculo do número de cópias inseridas no genoma da soja, e o tamanho esperado do fragmento amplificado.

Gene	Primer Foward	Primer Reverse	Sonda	Fragmentos
<i>GmLec</i>	5' TCCCGAGTGGGTGAGGATAG 3'	5' CATGCGATTCCCCAGGTATG3'	5' TETTCTCTGCTGC CACGGGACTCG 3'	65 pb
<i>AtDREB2</i> A	5' CCGAGAGTCAACAAAGTGGTT TT 3'	5' CGAGCTGAAACGGAGGTATTCC 3'	5' FAMCCGCTACAAA GCCTC 3'	69 pb

As amostras dos eventos transgênicos e da planta controle BR16 foram analisadas em três experimentos independentes, cada experimento constituído de uma placa, onde cada amostra foi amplificada em triplicatas. As reações de amplificação foram realizadas utilizando o kit *TaqMan® PreAmp Master Mix* (*Applied Biosystems*) conforme instruções do fabricante e conduzidas em termociclador 7300 *Real Time System* (*Applied Biosystem*), nas seguintes condições

de ciclagem: 50°C por 2 min, denaturação de 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1min. As eficiências de amplificação para cada par de *primers* foram realizadas como já descrito em itens anteriores. Os resultados obtidos foram analisados por dois métodos diferentes de quantificação relativa.

2.3.1 Método $2^{-\Delta Ct}/2$

A expressão relativa do transcrito *AtDREB2A* foi determinada através do método $2^{-\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001) utilizando a expressão relativa do gene da lectina como normalizador e como amostra calibradora.

Para a metodologia $2^{-\Delta Ct}$ ser válida, as eficiências da amplificação do alvo e da referência devem ser aproximadamente iguais, uma maneira de se observar isso é analisar como o ΔCt varia com o modelo da diluição. Foi gerada então, diluições seriadas e conhecidas do cDNA alvo e do gene de referência (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}), a diferença destes resultou nos valores de ΔCt , que foram plotados em função do logaritmo da diluição.

O número de cópias foi calculado pela diferença entre o valor de Ct do gene alvo pelo do gene de referência. No cálculo do número de cópias da geração T_0 a fórmula $2^{-\Delta Ct}/2$ foi modificada para $2^{-\Delta Ct}$, uma vez que as plantas são hemizigotas nessa geração, e multiplicada por dois, para corrigir a proporção 2:1 do gene endógeno para o transgene. A cultivar BR16 não transformada foi utilizada como controle negativo (Livak e Schmittgen, 2001).

2.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *AtDREB2A* EM PLANTAS DE SOJA GMS

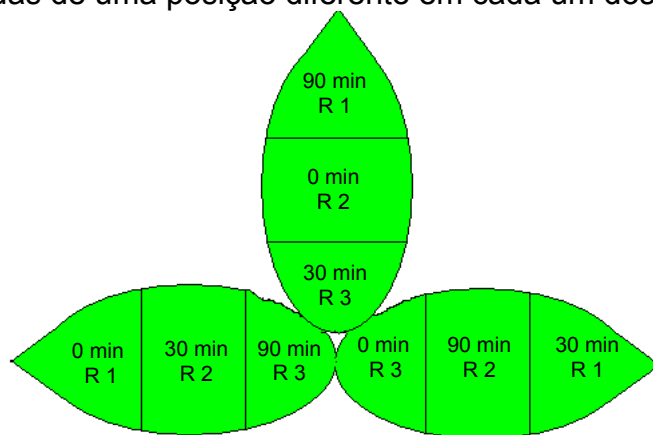
2.4.1 Experimento de Desidratação Celular

Para a análise do nível de expressão relativa do gene *AtDREB2A*, os eventos positivos P 1397 e P 2193 foram submetidos a um experimento de desidratação celular. Para a obtenção do material biológico, as plantas foram cultivadas em latossolo vermelho distroférico por 60 dias, em casa de vegetação, utilizando irrigação por gotejamento (duas vezes ao dia por 5 min) e com temperatura de 28°C \pm 3°C.

O experimento (Kariola et al., 2006) foi realizado coletando-se um

trifólio de cada planta a ser analisada (P 1397 e P 2193 nas gerações T_0 e T_1). Cada folíolo do trifólio foi segmentado em 3 partes, cada um representando as repetições técnicas (R1, R2 e R3) do experimento (Figura 03). Trifólios da cultivar BR16 não transformada foram utilizados como controles negativos e os tratamentos aplicados foram constituídos de três tempos de desidratação celular. A amostra controle (T0 min) foi coletada e estocada imediatamente em nitrogênio líquido, enquanto as amostras T30 min e T90 min de tratamento foram submetidas ao estresse de desidratação celular em câmara climatizada BOD, a 30°C e 59 % umidade, por 30 e 90 min, respectivamente. Após a aplicação do estresse, as amostras foram imersas em nitrogênio líquido e imediatamente armazenadas a -80°C até o momento da extração do RNA total.

Figura 3 - Trifólio de soja esquematizando os tratamentos do experimento de desidratação celular, T0 min (controle), T30 min e T90 min. Cada folíolo foi dividido em três partes e as amostras submetidas ao estresse de desidratação em câmara climatizada BOD, a 30°C e 60 % umidade. R 1, R 2 e R 3 indicam as repetições de cada tempo de tratamento, estas foram retiradas de uma posição diferente em cada um dos folíolos.



2.4.2 Experimento de Hidroponia

Para simular a condição de déficit hídrico nas raízes das plantas positivas selecionadas, um experimento de hidroponia foi instalado (Martins et al., 2008).

Dessa maneira, sementes do evento P 2193 (geração T_2 , vindas da planta 6 da geração T_1) e da planta controle BR16 não transformada foram germinadas em câmara de crescimento (30°C e 60% de umidade) por aproximadamente quatro dias, e a seguir, as plântulas foram transferidas para

suportes de polipropileno expandido apoiados em caixas plásticas (36 L) contendo solução nutritiva (Hewitt, 1963) de modo que as raízes ficassem imersas. O experimento foi realizado em casa de vegetação. No estágio de crescimento V₃ (plantas que possuem 18 a 23 cm de altura, quatro nós e folíolos desdobrados), uma reação de PCR com *primers* específicos para a construção *rd29A:AtDREB2A* foi realizada, as plantas positivas identificadas e submetidas ao estresse de déficit hídrico. O tratamento foi aplicado esgotando-se a solução nutritiva das caixas, e expondo as raízes a desidratação; no escuro, conforme Martins et al., (2008). Os tratamentos foram de T0 min (controle - sem estresse), T30 min de estresse, T60 min de estresse e T90 min de estresse. Os tratamentos foram realizados em triplicatas, onde cada planta foi considerada como uma repetição. Durante a aplicação dos tratamentos foram mantidas condições controladas de temperatura ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa ($60 \pm 5\%$) na casa de vegetação. Os tempos de tratamento foram rigorosamente cronometrados e a coleta do material foi realizada o mais rapidamente possível, coletando as amostras em nitrogênio líquido e posteriormente armazenando-as a -80°C , para evitar possíveis diferenças de expressão gênica decorrentes da manipulação dos tecidos.

Durante a imposição dos tratamentos, a taxa fotossintética, a condutância estomática, a taxa de transpiração e a diferença da temperatura do ambiente e da temperatura foliar foram medidas utilizando-se o equipamento portátil de medição de fotossíntese LI-6400 (*Portable Photosynthesis System*). As medições foram realizadas nas triplicatas de cada tratamento, e todas as plantas analisadas tiveram medições individuais realizadas.

2.4.3 Extração de RNA e Síntese de cDNA

O RNA total das amostras P 1397, P 2193 e BR16 (planta controle não transgênica) submetidas a ambos os experimentos foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. A seguir, para a síntese do cDNA, 5 µg de RNA total tratado com DNase foi transcrito em primeira fita utilizando transcriptase reversa M-MLV conforme recomendações do fabricante. O cDNA foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop 1000) e a integridade foi analisada em 1% gel de agarose com tampão SB.

2.4.4 Quantificação da Expressão Gênica Relativa via PCR Quantitativo (qPCR)

Os níveis de expressão gênica das amostras transgênicas e do controle BR16 submetidos à desidratação celular e ao estresse hídrico por hidroponia foram analisados por PCR quantitativo (qPCR). Para normalização da reação, os genes *GmrRNA18S* (Acesso No.: X02623.1) e *Gmβ_actina* foram utilizados como referência (Bhatia et al., 1994) (Peng et al., 2007). A referência *Gmβ_actina* não foi utilizada no experimento de desidratação celular da geração T₀. Os pares de *primers* e as sondas foram desenhados pelo programa *Primer Express 2.0* (*Applied Biosystem*) e o *assay AtDREB2A* foi desenhado pela *Applied Biosystems* (Tabela 03).

Tabela 3 - Sequências de *primers* e sondas dos genes *GmrRNA18S*, *Gmβ_actina* e *AtDREB2A*, utilizados para análise de expressão gênica e o tamanho esperado dos fragmentos amplificados.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Sonda	Fragmentos
<i>GmrRNA18S</i>	5' GGTTGACAGACTGA GAGCTCTTTC 3'	5' CAAATCGCTCCAACCTAAGAA C 3'	5' VICCACCACCCATAGAAT CAA 3'	76 pb
<i>Gmβ_actina</i>	5' TTGCCTGATGGACA GGTCATT 3'	5' CAATCAGAGAAGGCTGGAA CAGT 3'	5' AGGTTCTGAGAGATTCCG TTGCCAGA 3'	79 pb
<i>AtDREB2A</i>	5' CCGAGAGTCAACAA AGTGGTTTT 3'	5' GGGAAGCTTGCCATAGATG CAATCAATCAAACCT 3'	5' FAMCCGCTACAAAGCCTC AACTACGGAATACCT 3'	79 pb
<i>AtDREB2A Assay</i>	5' CAGGCCCGAGAGTC AACAAA 3'	5' GAGGTATTCCGTAGTTGAG GCTTT 3'	5' TAGCGGATCAAAACCAC 3'	62 pb

As amostras foram amplificadas para o gene alvo *AtDREB2A* e para os genes referência *GmrRNA18S* e *Gmβ_actina* utilizado o kit *TaqMan® PreAmp Master Mix* (*Applied Biosystems*) conforme as instruções do fabricante. Apenas na geração T₀ do experimento de desidratação celular o gene *Gmβ_actina* não foi utilizado como referência.

As reações foram conduzidas em triplicatas biológicas e técnicas no termociclador 7300 *Real Time System* (*Applied Biosystem*), nas seguintes condições de ciclagem: 50°C por 2 min, desnaturação de 95°C por 10 min, seguidos de 40-45 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min para o experimento de desidratação celular na geração T₀. Para quantificação da expressão gênica no experimento de desidratação celular (geração T₀) foram utilizados o par de primers e a sonda, já na geração T₁ e no experimento de hidroponia foi utilizado o *assay AtDREB2A*. As

melhores concentrações da sonda, dos *primers* e do *assay* foram otimizadas e curvas de diluição de cDNA, obtidas pelos valores de Ct gerados nas amplificações. Essas curvas de diluição geraram a equação da reta, onde o valor do *slope* que representa a inclinação da reta é utilizado na fórmula de eficiência de amplificação ($E = 10^{(-1/slope)} - 1$).

Na análise dos dados de expressão gênica das amostras testadas foi utilizado o programa *RESTmsc (Relative Expression Software Tool)* (Pfaffl et al., 2002). Esse programa introduz técnicas de randomização e *bootstrapping*, utilizando intervalos de confiança que avaliam a significância estatística dos desvios e sua provável magnitude. A aleatorização utilizada pelo programa leva em consideração que se qualquer variação perceptível entre as amostras e o controle ocorrer devido apenas ao acaso, pode-se trocar aleatoriamente valores entre os dois grupos e não será observada diferença maior. A fórmula utilizada pelo programa; em que os dados de Ct são é:

$$\text{Expressão} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta Ct_{\text{alvo}} (\text{média do calibrador} - \text{média da amostra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}} (\text{média do calibrador} - \text{média da amostra})}}$$

onde, E_{alvo} é a eficiência do gene alvo (transgene);

E_{ref} é a eficiência do gene referência.

Como resultado o programa expressa o número de vezes que a expressão relativa do grupo é maior do que os dados da amostra e a probabilidade do resultado estar correto, indicando se o transcrito é superexpresso, reprimido ou igual ao calibrador (tratamento que está sendo utilizado como controle).

3 RESULTADOS

3.1 ALINHAMENTO GLOBAL

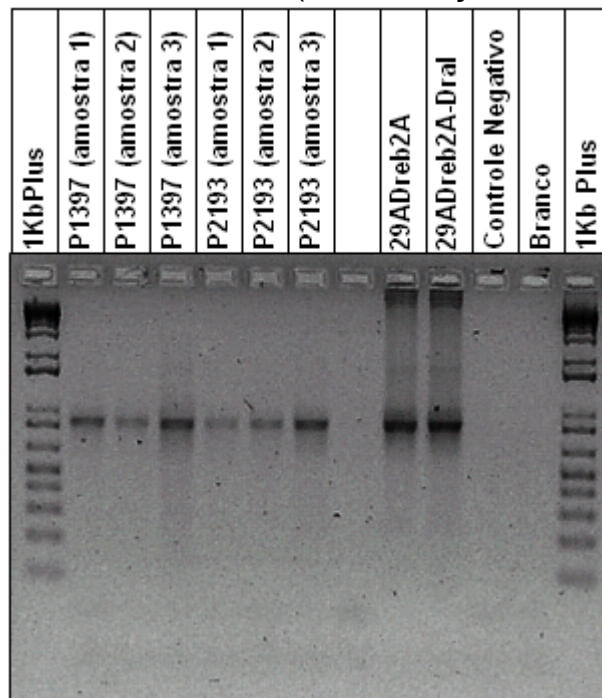
Os resultados obtidos das análises *in silico* de alinhamento global realizado com as diferentes sequências de genes homólogos *DREB*, encontrados no reino vegetal, está apresentado na árvore filogenética (Figura 04). As sequências foram obtidas do banco de nucleotídeos do NCBI, alinhadas pelo Clustal X e a árvore filogenética desenhada pelo MEGA 4.0.

Alinhamentos realizados pelo programa Clustal X e *Vector NTI Advance[™] 10 (Invitrogen)* foram utilizados principalmente no desenho de *primers*,

PCR positivas vivas. Isso resulta em uma eficiência de transformação de 1,19%, se considerado o número total de embriões bombardeados e o número de plantas positivas sobreviventes.

Para avaliar a possibilidade de quimerização na parte aérea de cada planta, uma PCR que amplifica fragmentos do transgene inserido, foi realizada utilizando-se DNA extraído de três amostras de tecido foliar coletados em diferentes partes das plantas *AtDREB2A* P 1397 e P 2193, na geração T₀ (Figura 06).

Figura 6 - Análise eletroforética para verificar a ocorrência de quimerização. Três diferentes amostras de DNA coletadas dos eventos P 1397 e P 2193 foram avaliadas e amplificadas com o par de *primers* específicos para a construção gênica *rd29A:AtDREB2A* (1975 pb). Controle positivo: plasmídeo *AtDREB2A -29ADREB2A* e *29ADREB2A-DraI* (DNA digerido com a enzima de restrição *DraI*), controle negativo – amostra da cultivar BR16 não transformada e branco (contaminação da amostra).



Foi calculada a segregação do transgene no evento positivo P 2193, único evento até o momento em gerações mais avançadas. Os resultados indicaram que esse evento obedece a 1ª Lei de Mendel em todas as plantas avaliadas na geração T₁ e não obedece a 1ª Lei de Mendel nas plantas P 2193.2 e P 2193.7 da geração T₂ (Tabela 04).

Tabela 4 - Teste de qui-quadrado com base nas leis de segregação Mendeliana realizado para calcular a segregação do transgene *AtDREB2A* no evento P 2193, nas gerações T₁ e T₂.

Evento e Geração	Total de Plantas	Plantas Positivas	Plantas Negativas	(O - E) ² /E	Significância*
P 2193 T ₁	10	7	3	0,1333	NS
P 2193.1 T ₂	51	44	7	3,4575	NS
P 2193.2 T ₂	45	0	45	135	S
P 2193.3 T ₂	52	37	15	0,410	NS
P 2193.4 T ₂	28	25	3	3,048	NS
P 2193.5 T ₂	46	29	17	3,507	NS
P 2193.6 T ₂	38	18	20	15,474	NS
P 2193.7 T ₂	26	0	26	78	S

*Significância: probabilidade de 0,01 de rejeitar acidentalmente uma hipótese nula verdadeira, ou seja, que o gene segrega na mesma proporção que a 1ª Lei de Mendel.

3.3 Análise do Número de Cópias do Transgene *AtDREB2A* no Genoma da Soja

Para caracterizar o número de cópias do transgene inseridas no genoma das plantas de soja GMs, foram selecionados diferentes eventos na geração T₀, incluindo os eventos P 1397 e P 2193, e na geração T₁ foram selecionadas 2 plantas provenientes do evento P 1397 e 2 resultantes do evento P 2193. O número de cópias foi calculado com base na quantificação relativa dos transcritos.

Depois da otimização do processo e do cálculo da eficiência dos *primers*, 1,02 para o transgene *AtDREB2A* e 0,97 para o gene *GmLectina*, o número de cópias do transgene *AtDREB2A* foi calculado utilizando-se o método $2^{-\Delta Ct/2}$. Os resultados mostraram que os diferentes eventos analisados possuem de 2 a 50 cópias do transgene (Tabela 05).

A equação utilizada na análise foi modificada para $2^{-\Delta Ct} \times 2$ nas plantas T₀, pois, em razão da inserção do transgene, elas são hemizigóticas para o gene *AtDREB2A*, portanto, cada planta possui apenas uma cópia do transgene inserido no genoma diplóide, assim não se divide o valor por dois e multiplica-se o valor do resultado por dois para corrigir a proporção 2:1 do gene lectina em comparação com o transgene inserido num genoma diplóide.

Tabela 5 -Determinação do número de cópias do transgene *AtDREB2A* nas gerações T_0 e T_1 , por PCR quantitativo utilizando o método $2^{-\Delta Ct}/2$. A 1ª coluna apresenta os eventos selecionados; a 2ª e 3ª mostram os resultados dos experimentos independentes e na 4ª coluna a média dos três experimentos, a 5ª, 6ª, 9ª mostram, respectivamente, o desvio padrão (SD), coeficiente de variação (CV%) e o número de cópias estimado.

Amostr a	1ª	2ª	Médi a 2 ^{-ΔCt}	SD 2 ^{-ΔCt}	CV% 2 ^{-ΔCt}	SD+	SD-	Nº de cópias
	Experimen to	Experimen to						
P 1397	15,95	10,35	13,15	3,96	30,15	17,11	9,18	9 a 17
7186	8,39	5,73	7,06	1,88	26,60	8,94	5,18	5 a 9
P 7413	4,95	3,98	4,47	0,69	15,45	5,16	3,78	4 a 5
P 2193	966,38	225,89	596,1 4	523,61	87,83	1119,74	72,53	Elevado**
P 7195	9,36	6,74	8,05	1,85	23,00	9,91	6,20	6 a 10
P 7417	4,05	2,92	3,49	0,80	22,95	4,29	2,69	3 a 4
P 7212	6,84	5,09	5,97	1,24	20,75	7,21	4,73	5 a 7
P 7418	7,9	5,66	6,78	1,58	23,44	8,37	5,19	5 a 8
P 7231	6,23	4,25	5,24	1,40	26,72	6,64	3,84	4 a 7
P 7430	4,33	3,2	3,77	0,80	21,13	4,56	2,97	3 a 5
P 7256	9,44	4,88	7,16	3,22	45,12	10,39	3,93	4 a 10
P 7374	3,12	2,32	2,72	0,57	20,86	3,29	2,15	2 a 4
P 7431	14	8,56	11,28	3,84	34,07	15,12	7,44	7 a 15
P 7174	6,17	3,88	5,03	1,62	32,26	6,65	3,41	3 a 7
P 7393	4,61	3,15	3,88	1,03	26,62	4,91	2,85	3 a 5
P 7531	9,23	5,91	7,57	2,34	30,94	9,91	5,23	5 a 10
P 1397.1 (T ₁)*	0,07	0,05	0,06	0,01	20,41	0,07	0,05	Negativa***
P 1397.2 (T ₁)	2,94	1,7	2,32	0,88	37,85	3,20	1,44	1 a 3
P 2193.8 (T ₁)	0,76	0,53	0,65	0,16	25,29	0,81	0,48	Negativa
P 2193.9 (T ₁)	4,14	2,12	3,13x	1,43	45,68	4,56	1,70	2 a 5

*Amostras com (T₁) indicam amostras descendentes da geração T₀, ou seja, geração T₁. Os resultados do número de cópias da geração T₁ foram divididos por dois, já que essas plantas deixaram de ser hemizigotas. Número seguido do ponto nas plantas T₁ indicam qual descendente foi analisado.

**Valores elevados de fluorescência produzem saturação do sinal, levando imprecisão no resultado.

*** Amostras com valores menores que 1 são considerados como negativas

De acordo com esses resultados, pode-se verificar que dentre as plantas analisadas na geração T₁, quando comparadas com os resultados da geração T₀, as plantas P1397.1, P 1397.2, P 2193.8 e P 2193.9 perderam respectivamente, todas, duas, 48 e 47 cópias do transgene durante o processo de

segregação.

3.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO TRANSGENE *AtDREB2A* EM SOJA GM SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSES ABIÓTICOS

Amostras de folhas dos eventos P 1397 e P 2193 foram submetidas ao estresse de desidratação celular (geração T_0 e T_1), enquanto amostras de folhas e raízes do evento P 2193 foram submetidas ao estresse por déficit hídrico, através do sistema de hidroponia (geração T_2) visando avaliar a expressão gênica relativa do transgene *AtDREB2A* pela técnica de PCR quantitativo. Em ambos os experimentos os níveis dos transcritos de *AtDREB2A* após 30 e 90 minutos de estresse, e 60 min no experimento de hidroponia, foram comparados com os respectivos tempos da cultivar BR16, bem como em relação ao tempo zero de indução de cada evento transgênico. Os valores de eficiência de cada set de *primers* e sonda está demonstrado na tabela 06.

Tabela 6 - Valores de eficiência calculada para cada gene na quantificação relativa do transgene *AtDREB2A*. Valores calculados pela curva de diluição do cDNA dos valores dos experimentos, dado o *slope* de cada curva.

Gene	Geração	Experimento	Valor
<i>AtDREB2A</i>	T_0	Desidratação Celular	2,03
<i>GmrRNA18S</i>	T_0	Desidratação Celular	2,01
<i>AtDREB2A</i>	T_1 e T_2	Desidratação Celular e Hidroponia	2,04
<i>GmrRNA18S</i>	T_1 e T_2	Desidratação Celular e Hidroponia	1,86
<i>Gmβ_actina</i>	T_1 e T_2	Desidratação Celular e Hidroponia	1,93

3.4.1 Expressão Gênica do Transgene *AtDREB2A* em Ensaio de Desidratação Celular

Os resultados de expressão gênica dos eventos transgênicos nos experimentos de desidratação celular resultantes da análise com base no programa REST msc estão plotados na tabela 07.

Tabela 7 - Expressão Relativa do transgene *AtDREB2A* analisada pelo programa *RESTmsc*. O Erro Padrão (SE) é calculado em relação à mediana, *p_value* (0,1). Valores UP (do inglês *up-regulated*) presentes no gráfico indicam valores significativamente diferentes do grupo controle.

Experimento	Calibrador	Evento	Tempo	Expressão	Perfil de expressão*	SE	p_value
Desidratação T ₀	BR16	P 1397	0 min	1,991	-	±2,261	0,559
			30 min	89,208	-	±138,101	0,110
			90 min	5,079	-	±9,766	0,241
		P 2193	0 min	725	-	±1744,790	0,144
			30 min	535,159	UP	±1308,681	0,004
			90 min	146,062	UP	±202,961	0,003
	P 1397 T0 min	P 1397	30 min	142,105	UP	±84,876	0,001
			90 min	36,960	UP	±64,366	0,038
	P 2193 T0 min	P 2193	30 min	2,34	-	±619,256	0,931
			90 min	2,918	-	±4,09E+05	0,692
Desidratação T ₁	BR16	P 1397	0 min	11,287	UP	±12,913	0,072
			30 min	0,861	-	±1,104	0,965
			90 min	0,001	UP	±0,002	0,022
		P 2193	0 min	111,091	UP	±247,048	0,081
			30 min	0,275	-	±0,312	0,545
			90 min	8,298	-	±10,502	0,141
	P 1397 T0 min	P 1397	30 min	0,353	-	±0,412	0,454
			90 min	1,032	-	±162,985	0,996
	P 2193 T0 min	P 2193	30 min	2,340	-	±6,193	0,931
			90 min	2,918	-	±4,435	0,669

*Perfil de expressão determinado quando os valores de expressão das plantas sob estresse hídrico divergem do controle pelos testes de aleatorização (n=2000 iterações) a 10% de probabilidade.

Na geração T₀ os resultados mostraram que o evento P 1397 expressou o transgene *AtDREB2A* nos tratamentos T30 min e T90 min de desidratação celular 142,105 vezes ($p > 0,001$) e 36,96 vezes ($p > 0,038$) quando comparado com a condição controle (tempo 0 min) (Figura 07). Já o evento P 2193, quando submetido às mesmas condições de tratamento, apresentou um aumento na expressão gênica relativa do transgene de 2,34 vezes mais no tempo T30 min e 2,918 vezes mais no tempo T90 min, porém, de acordo com análise estatística, não houve expressão gênica diferencial do transgene nestes tratamentos quando comparados com o respectivo controle ($p > 0,1$) (Figura 07).

Quando avaliados na geração T₁, o transgene não foi diferencialmente expresso em nenhum dos dois eventos avaliados, mesmo após 90

min de estresse hídrico. Apenas na P 1397, a expressão do transgene foi de 0,412 ($p > 0,454$) no T 90 min, demonstrando dessa forma de forma não significativa, a repressão do transgene.

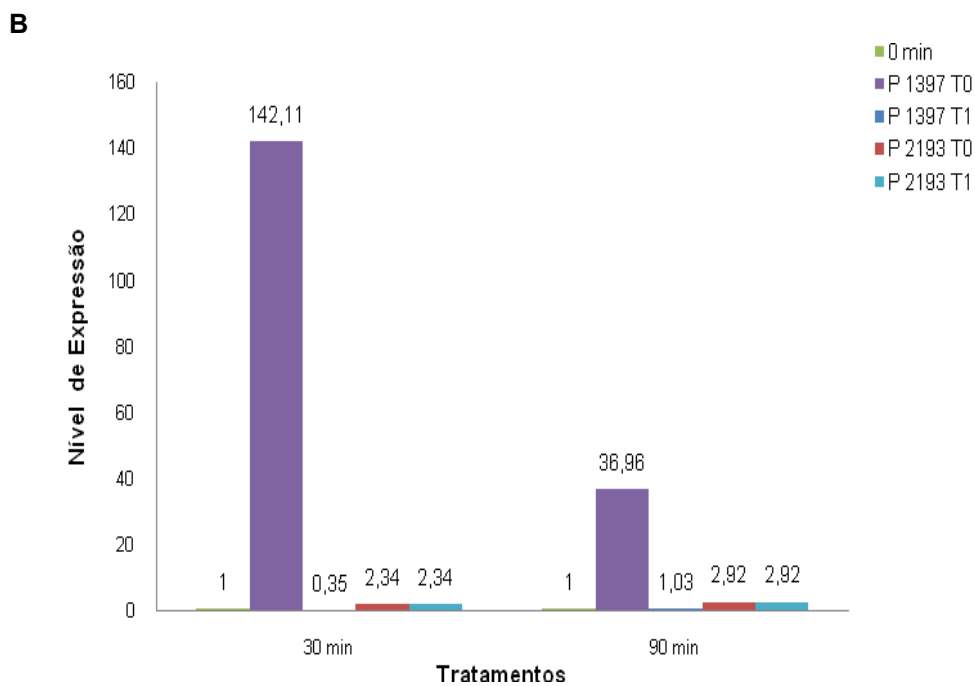
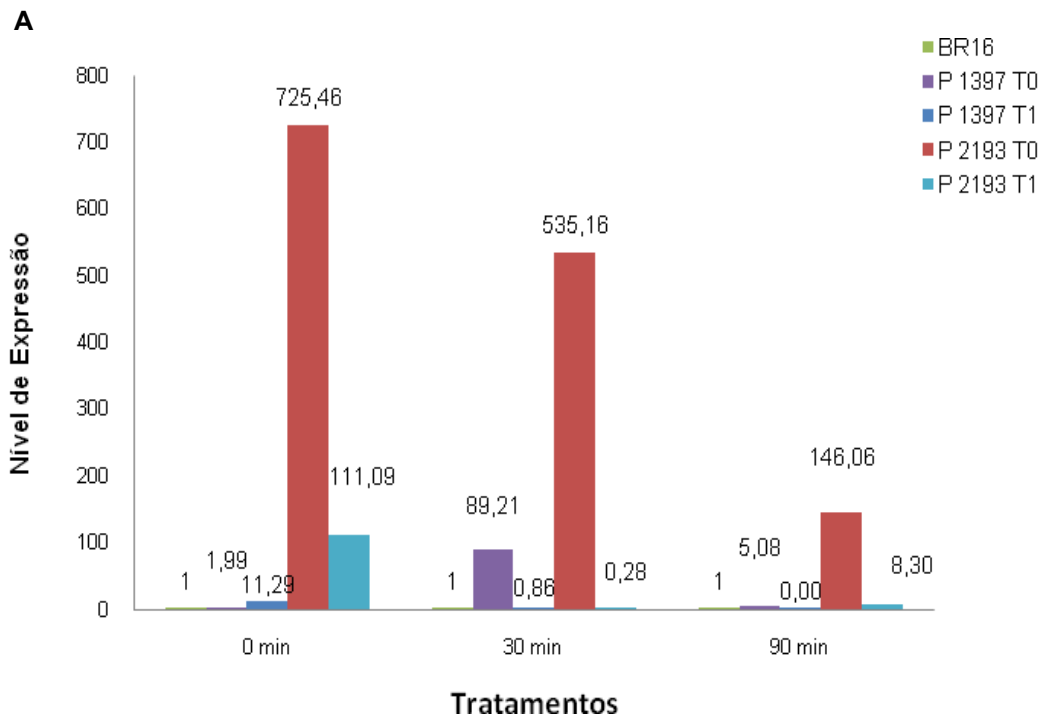
Quando os níveis dos transcritos de *AtDREB2A*, na geração T_0 , no evento transgênico P2193 foram comparados com os da cultivar BR16, não transformada, os valores de expressão foram elevados, atingindo os valores de 725, 535,159 e 146,062 vezes mais expressos respectivamente, nos tempos de T_0 , T_{30} e T_{90} min, e estatisticamente significativos em T_{30} e T_{90} ($p > 0,144$, $p > 0,004$ e $p > 0,003$). No entanto, tal resultado não foi observado no evento P1397, onde os maiores níveis dos transcritos de *AtDREB2A* foram observados após 90 min de estresse (5,079, $p > 0,241$), e em todos os tempos os valores não foram estatisticamente significativos.

De modo similar, quando avaliada na geração T_1 , os elevados níveis dos transcritos de *AtDREB2A* se mantiveram no evento P 2193 (T_0 – 111,091 vezes; $T_{30\text{min}}$ – 0,275 vezes e $T_{90\text{ min}}$ 8,298 vezes), principalmente após 90 min de estresse, no entanto, em P 1397 houve uma redução nos níveis de expressão do transgene.

Quando comparados os níveis de expressão obtidos nas gerações T_0 e T_1 dos eventos positivos P 1397 e P 2193 com o tempo T_0 min de cada evento, (Figura 07B) observou-se que a expressão do transgene diminuiu em todos os tempos da geração T_1 em comparação com a geração T_0 .

Ao avaliar os valores de expressão dos dois eventos transgênicos nas gerações T_0 e T_1 , submetidas à desidratação celular, e utilizando no cálculo de expressão o tempo T_0 min de cada evento, os resultados mostraram que a planta P 1397 na geração T_0 teve maior expressão gênica (Figura 7B).

Figura 7 - Comparação da expressão gênica relativa do transgene *AtDREB2A* nas gerações T_0 e T_1 do eventos P 1397 e P 2193, sob condições de desidratação celular. A expressão do transgene foi normalizada com os genes referências *GmrRNA18S* na geração T_0 e *Gm β _actina* e *GmrRNA18S* na geração T_1 e calibrada com relação a planta controle BR16 (A) e com o tempo T0 min de cada evento (B). As análises foram realizadas pelo Programa *RESTmsc*.



3.4.2 Experimento de Hidroponia no Evento P 2193 na Geração T₂

Os resultados foram analisados pelo programa *RESTmsc* que compara aleatoriamente cada tratamento com seu respectivo controle, ou seja, cada tratamento do evento P 2193 na geração T₂ foi comparado ao tempo controle T0 min e com a planta controle BR16, não transformada (Tabela 08).

Tabela 8 - Expressão Relativa do transgene *AtDREB2A* analisada pelo programa *RESTmsc*. O Erro Padrão (SE) é calculado em relação à mediana, *p_value* (0,1). Valores UP (do inglês *up-regulated*) presente no gráfico indicam valores significativamente diferentes do grupo controle.

Experimento	Calibrador	Órgão	Tempo	Expressão	Perfil de Expressão*	SE	p_value
Hidroponia P 2193 T ₂	BR16	Folha	0 min	121,72	UP	±114,471	0,001
			30 min	907,504	UP	±146,812	0,001
			60 min	1041,993	UP	±145,231	0,001
			90 min	508,671	UP	±497,881	0,001
		Raiz	0 min	901,272	UP	±111,396	0,001
			30 min	857,812	UP	±119,971	0,001
			60 min	27749,681	UP	±137,846	0,001
			90 min	1363,157	UP	±182,834	0,001
	P 2193 T0 min Folha	Folha	30 min	7,878	-	±10,249	0,154
			60 min	8,863	-	±11,467	0,157
			90 min	7,071	-	±9,168	0,209
	P 2193 T0 min Raiz	Raiz	30 min	1,653	-	±0,898	0,354
			60 min	30,301	UP	±11,844	0,003
			90 min	4,176	-	±3,171	0,151

*Perfil de expressão determinado quando os valores de expressão das plantas sob estresse hídrico divergem do controle pelos testes de aleatorização (n=2000 iterações) a 10% de probabilidade.

A quantificação da expressão relativa do transgene *AtDREB2A* foi realizada na geração T₂ do evento positivo P 2193, sob estresse hídrico em sistema hidropônico. Comparando as amostras estressadas do evento P 2193 com sua própria amostra controle no T0 min, pode-se verificar que no tratamento T60 min, o transgene foi 30 vezes mais expresso em raízes ($p > 0,003$), enquanto que, nos demais tempos não houve reexpressão diferencial (2 e 4 vezes mais, $p > 0,354$ e $p > 0,151$), nos tempos de T30 min e T90 min (Figura 08). Este resultado de não expressão gênica foi semelhante ao obtido nas folhas, onde todos os tempos foram não estatisticamente significativos.

Quando cada tratamento foliar analisado foi comparado com o respectivo tratamento na planta controle BR16, o transgene foi superexpresso em

122x, 907x, 1042x e 509x ($p > 0,001$) respectivamente, nos T0 min, T30 min, T60 min e T90 min. Resultados semelhantes de maiores níveis de expressão gênica, no tempo de tratamento T60 min, foi observado nas raízes submetidas à hidroponia, porém, com valores maiores de expressão gênica, sendo o transgene expresso 901x, 858x, 27750x e 1363x mais nas condições respectivas de T0 min, T30 min, T60 min e T90 min de tratamento ($p > 0,001$) (Figura 09).

Figura 8 - Comparação da expressão gênica relativa do transgene *AtDREB2A* na geração T₂ do evento P 2193 em folhas e raízes sob condições de estresse hídrico. A expressão do transgene foi normalizada com os genes referências *GmrRNA18S* e *Gm β _actina* e calibrada com relação ao transgene no tempo T0 min do mesmo evento. As análises foram realizadas pelo Programa *RESTmsc*.

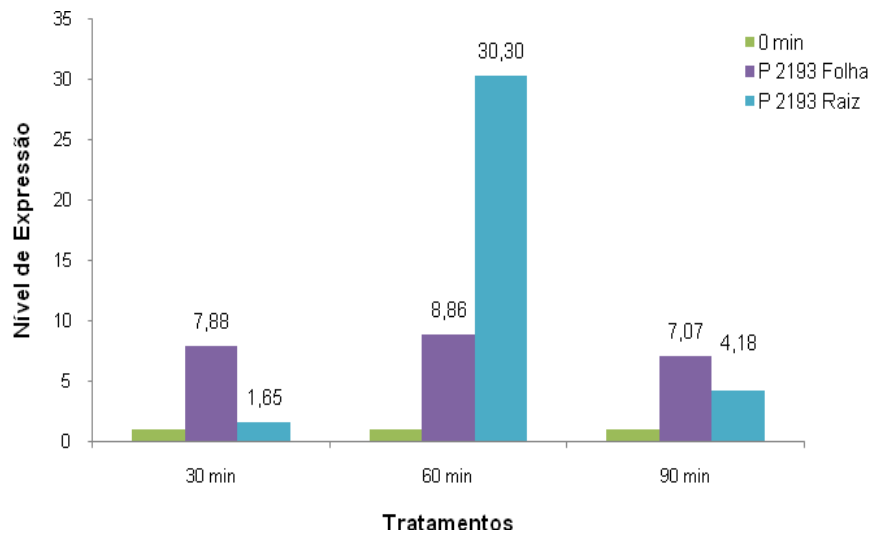
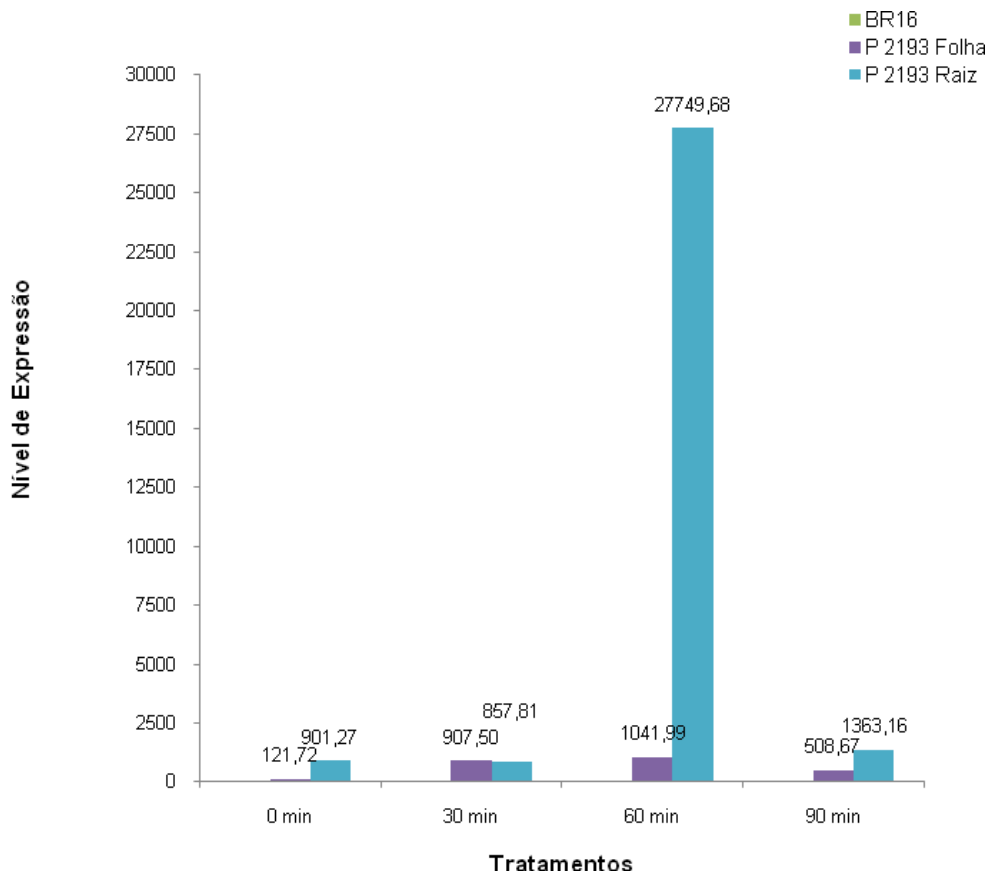


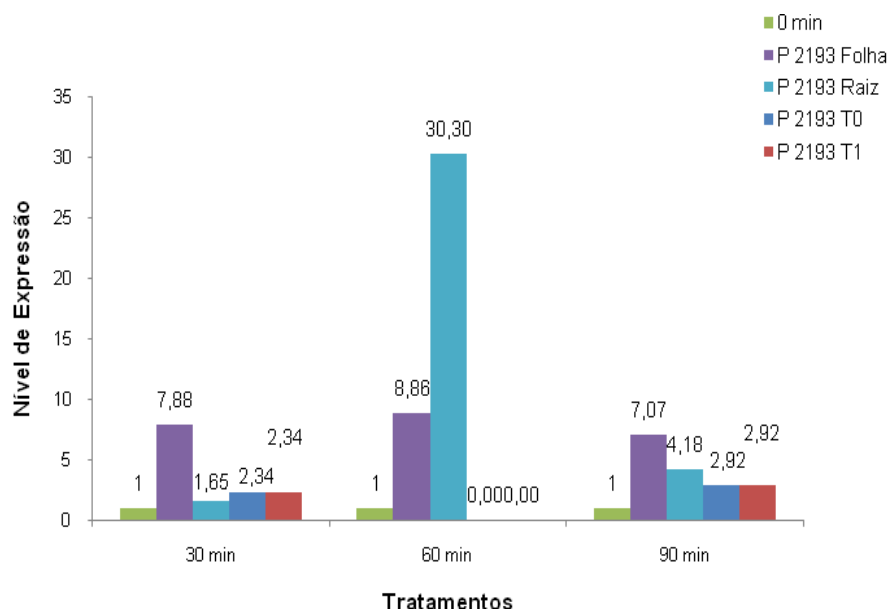
Figura 9 - Comparação da expressão gênica relativa do transgene *AtDREB2A* na geração T_2 do evento P 2193 em folhas e raízes sob condições de estresse hídrico. A expressão do transgene foi normalizada com os genes referências *GmrRNA18S* e *Gm β _actina* e calibrada com os respectivos tempos da planta controle BR16 ($p > 0,001$). As análises foram realizadas pelo Programa *RESTmsc*.



Como observado na figura 10, o evento P 2193 foi analisado em três gerações diferentes utilizando como amostra calibradora o tempo controle de T0 min de cada evento. Os resultados demonstraram que na geração T_2 o transgene está sendo o mais expresso e a diferença da expressão é dependente da região da planta. A maior expressão observada em todos os experimentos de déficit hídrico ocorreu no tempo de T60 min da raiz, seguida dos tempos de T60 min, T30 min e T90 min dos tratamentos nas folhas (dados não significativos) e ainda, os tempos de T30 min e T90 min, nas gerações T_0 e T_1 , com 2,34 e 2,918 vezes mais expresso (dados não significativos). Foi observado também que nas gerações em que foram analisados os três tempos de estresse, o tempo T60 min foi o mais expresso (folha e

raiz), seguido do tempo de T90 min, com exceção dos resultados da folha na geração T₀, e por último o tempo de T30 min (não significativo) de tratamento de estresse.

Figura 10 - Comparação da expressão gênica relativa do transgene *AtDREB2A* na geração T₀, T₁ e T₂ do evento P 2193 em folhas e raízes sob condições de estresse hídrico. A expressão do transgene foi normalizada com os genes referências *GmrRNA18S* na T₀ e *Gmβ_actina* e *GmrRNA18S* na T₁ e T₂ e calibrada com relação ao transgene no tempo T₀ min do mesmo evento em cada um dos experimentos. As análises foram realizadas pelo Programa *RESTmsc*.



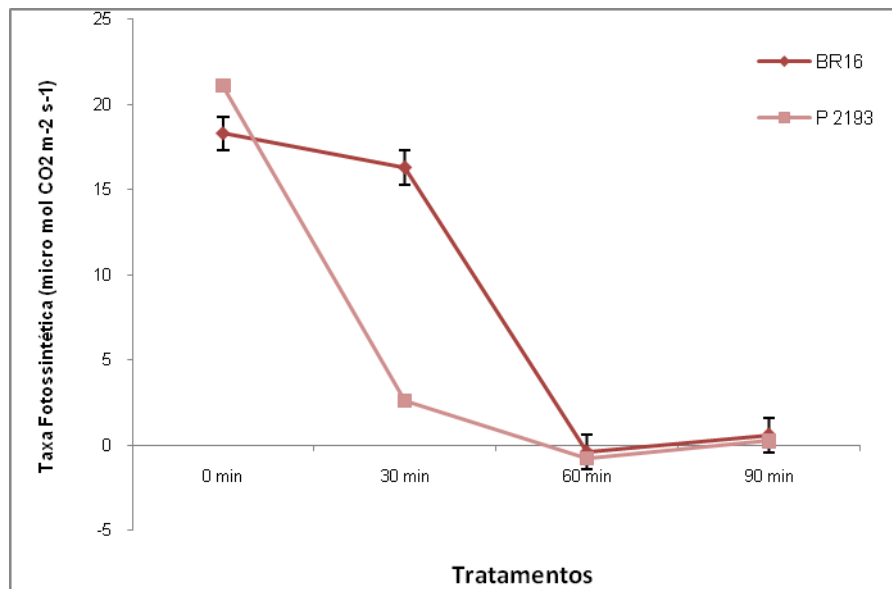
As leituras das análises fisiológicas realizadas pelo equipamento portátil LI-6400 durante a aplicação do estresse hídrico em sistema de hidroponia indicaram que na taxa fotossintética e na condutância estomática os valores T₀ min e T₃₀ min foram significativamente diferentes entre a planta controle BR16 e o evento GM P 2193, sendo que no T₀ min o valor da P 2193 foi maior que na BR16 e os T₆₀ min e T₉₀ min foram significativamente diferentes. Dentro das plantas o tempo controle foi diferente do T₃₀ min e T₆₀ min, e este igual ao T₉₀ min nas duas variáveis (Teste de Duncan com $p \leq 0,05$) (Figura 11).

A taxa de transpiração e a diferença da temperatura do ambiente e da temperatura foliar demonstraram que o único tempo de estresse estatisticamente diferente entre as plantas BR16 e o evento P 2193 foi o T₃₀ min. Dentro de cada planta estudada o tempo T₃₀ min foi igual ao tempo controle e o tempo de estresse

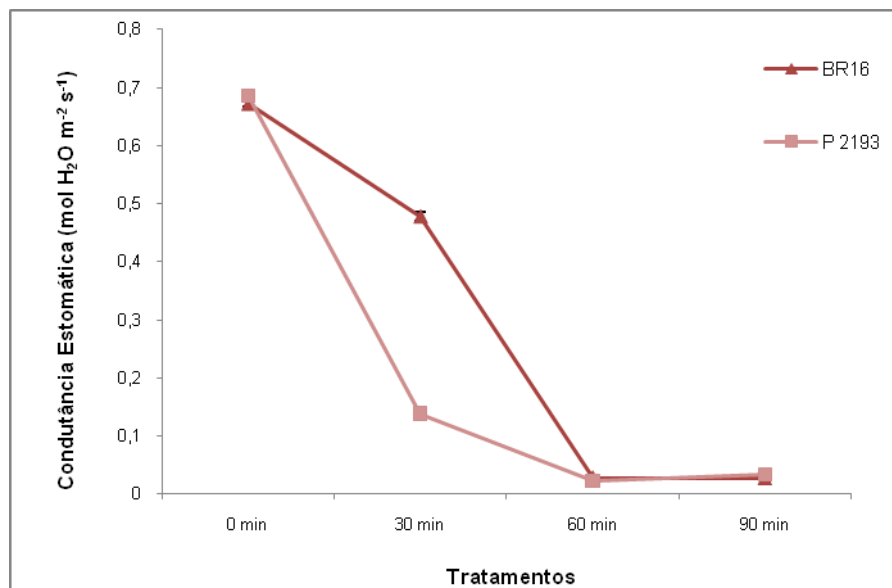
T60 min foi igual ao T 90 min. Da mesma forma que os valores de taxa fotossintética e de condutância estomática, o evento P 2193 apresentou os maiores valores no T0 min quando comparado com a BR16 não transformada (Teste de Duncan com $p \leq 0,05$) (Figura 11).

Figura 11 - Respostas fisiológicas da planta controle BR 16 e do evento transgênico P 2193 não estressados e estressados. Os tempos de estresse foram de T30 min, T60 min e T90 min. **A** Taxa Fotossintética, **B** Condutância Estomática, **C** Taxa de Transpiração, **D** Temperatura do Ambiente – Temperatura Foliar. Os traços verticais entre as linhas correspondem ao erro padrão. Nos pontos onde os traços não se sobrepõem indicam diferenças pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

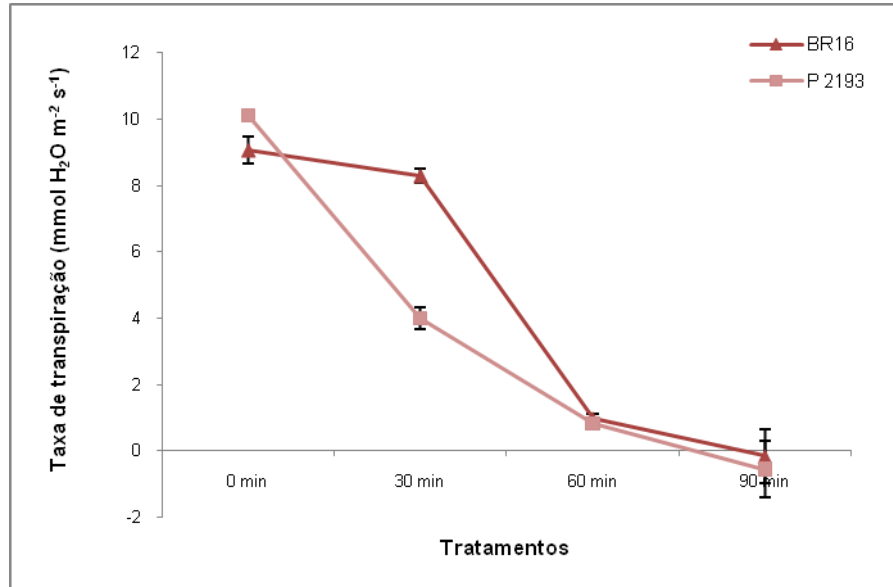
A



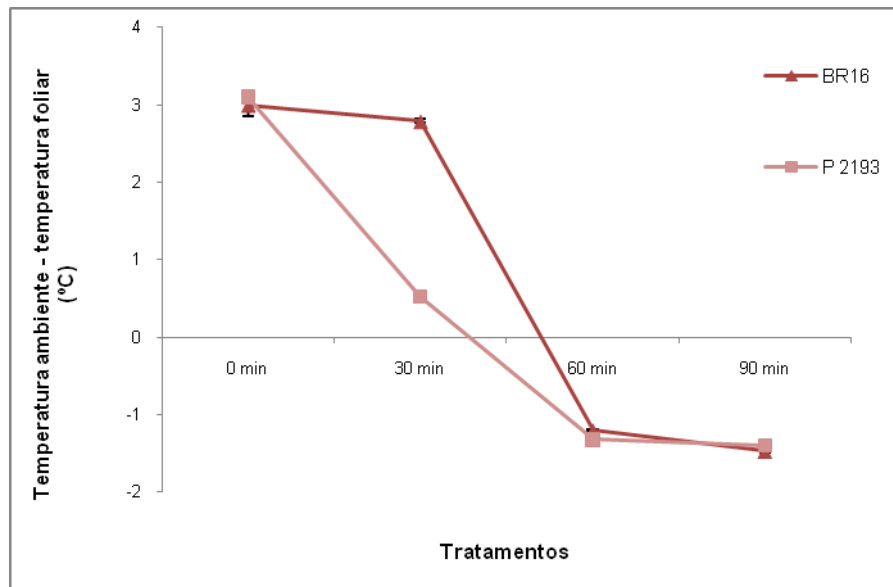
B



C



D



4 DISCUSSÃO

A árvore filogenética gerada a partir do alinhamento de várias sequências de *DREB2A* homólogos, provenientes de diferentes espécies vegetais, mostrou que pequenas diferenças encontradas nas regiões não conservadas (Sakuma et al., 2006) dos genes da família DREB, foram diferenciadas, indicando quais genes são filogeneticamente mais próximos.

Dessa maneira, os dados relacionados com os domínios dos genes *DREB* (de diversos organismos) demonstraram uma alta similaridade dentro dessa família, já relatada por Sakuma et al., (2006b) que mostrou que os genes da família DREB possuem um domínio altamente conservado, o AP2 (Riechmann e Meyerowitz, 1998; Sakuma et al., 2002). O transgene *AtDREB2A*, isolado de *Arabidopsis thaliana*, está no mesmo ramo filogenético que o gene *DREB2* de *Oryza sativa* (arroz) e relativamente próximo do gene *DREB2* de *Glycine max* (soja), sugerindo que a maquinaria da célula da soja poderia reconhecer e transcrever o gene de *A. thaliana* por possuir provavelmente as mesmas sequências nos locais de reconhecimento do gene endógeno (Sakuma et al., 2002).

Nos últimos anos, plantas geneticamente modificadas para o aumento da tolerância à seca vêm sendo obtidas através dos processos de transformação genética vegetal (Dhekney et al., 2009). Nesse contexto, a soja e outras culturas de grande importância econômica vêm passando por processos de transformação objetivando-se reduzir as perdas de produtividade.

Dentre as espécies vegetais que estão sendo transformadas destaca-se o arroz. Nesta cultura dentre os genes inseridos está o fator de transcrição AP37, da família APETALA2 (AP2) – mesma família do fator de transcrição *AtDREB2A*, que foi superexpresso, sob controle do promotor constitutivo OsOc1 (Oh et al., 2009). A inserção deste gene resultou em um aumento da tolerância à seca, ao frio e à alta salinidade em plantas de arroz GMs durante a fase vegetativa, e também em um aumento da produtividade de 16% a 57%, quando comparadas às plantas controle estressadas (Oh et al., 2009).

Estudos realizados em milho também propiciaram um aumento da tolerância desta cultura à seca, como observado no trabalho de Nelson et al., (2005) que inseriu no milho, o fator de transcrição *ZmNF-YB1* da família do fator nuclear Y (NF-Y). Sob mecanismos ainda desconhecidos, essas plantas transgênicas

desenvolveram a habilidade de maior tolerância à seca, como observado pelos parâmetros fisiológicos relativos ao estresse, incluindo o teor de clorofila, condutância estomática, temperatura foliar, murchamento e manutenção da fotossíntese. Estes mecanismos associados contribuem para a diminuição da perda na produtividade de grãos de milho, sob condições limitadas de água no solo.

Em tabaco, a inserção do gene que transcreve a enzima isopenteniltransferase, envolvida na senescência, retardou o processo catabólico no tecido foliar de plantas florescidas, sob condições de seca. Essas plantas transgênicas mantiveram alto conteúdo de água e fotossíntese reduzida, apresentando rendimento mínimo quando regadas com 30% da água necessária para o desenvolvimento normal da planta (Rivero, et al., 2007).

Em soja, um estudo foi realizado por Valente et al., (2008) que inseriu na cultura sob regulação do promotor constitutivo 35S o gene *BiP*, que transcreve uma chaperona atuante no retículo endoplasmático, em condições de desidratação. Esse mecanismo de tolerância à seca, ainda desconhecido, mas relacionado ao retículo endoplasmático, foi observado quando estas plantas transgênicas superexpressando o gene *BiP*, apresentaram as seguintes características: pequena diminuição no potencial de água, suas folhas não mostraram murchas, seus estômatos não se fecharam como nas plantas controles e suas taxas de fotossíntese e transpiração tornaram-se menos inibidas quando comparadas com o tratamento controle (Valente et al., 2008).

Outras pesquisas ainda, visando à obtenção de soja GM com maior tolerância à seca têm sido realizadas por nosso grupo de pesquisa, na Embrapa Soja. Utilizando o gene *AtDREB1A* e o promotor estresse induzido *RD29A*, embriões de soja foram transformados. Este gene transcreve o fator de transcrição DREB1A, ligante na região DRE dos promotores de genes que respondem ao déficit hídrico, frio e salinidade. Beneventi (2006) caracterizou o evento P58, positivo para o transgene *AtDREB1A*, que após submetido a condições de déficit hídrico, mostrou ser mais tolerante ao estresse quando comparado à planta controle.

No presente trabalho, foram obtidas 78 plantas positivas e vivas para o transgene *AtDREB2A CA*. Este gene foi primeiramente estudado pelos pesquisadores do JIRCAS que o caracterizaram como sendo um fator de transcrição com um domínio regulatório negativo (entre os nucleotídeos 136 a 165). Esse gene e similares de outras espécies foram superexpressos em várias espécies vegetais,

resultando em plantas de milho (Qin et al., 2007), arroz (Dubouzet et al., 2003), girassol (Almogueva et al., 2009), trigo (Terashima e Takumi, 2009), crisântemo e soja (Chen et al., 2007) mais tolerantes à seca, à salinidade, ao calor e ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Nossos resultados mostraram que embriões de soja foram transformados com sucesso com a construção gênica *rd29A:AtDREB2A CA*, através do processo de biobalística, obtendo-se uma eficiência final de 1,19%, levando-se em consideração o número de embriões bombardeados e o número de plantas positivas vivas e férteis obtidas (Rech et al., 2008). Esta eficiência foi considerada alta quando comparada com a transformação via biobalística realizada em soja com a construção gênica *DREB1A* que foi de 0,38% nas mesmas especificações metodológicas (Beneventi, 2006). A eficiência de 1,19% justifica-se principalmente pela perda de plantas na etapa de cultura de tecidos e no processo de aclimação durante o transplante da areia:vermiculita para vasos de terra, em casa de vegetação.

A caracterização dos eventos de soja gerados quanto ao número de cópias do transgene, indicaram que o evento P 2193 apresentou de 72 a 1120 cópias na geração T₀, e nas duas amostras da planta P 2193 da geração T₁ foram detectados, respectivamente, zero e duas a cinco cópias do transgene (segregação dos insertos não ligados). Já no evento P 1397 foi detectado de nove a 17 cópias na geração T₀ e nas duas plantas da geração T₁, zero e uma a três cópias. Essa perda de altos números de cópias nos dois eventos indica que houve uma inserção com várias cópias, com isso quando foi perdida uma inserção, perdeu-se várias cópias de uma geração para outra. Outra resposta é que na geração T₁ as plantas podem ser tanto homozigóticas como heterozigóticas, e a fórmula do cálculo do número de cópias leva em consideração apenas as plantas homozigóticas, já que divide o valor final obtido por dois, para levar em consideração as hemizigóticas, não deveria ter-se dividido o valor final por dois. Apesar de eventos com integração de múltiplas cópias muitas vezes não possuem a unidade transcricional completa, e ainda outros fatores como metilação, acetilação e remodelamento de cromatina serem responsáveis pelo silenciamento transcricional e pós-transcricional do transgene em múltiplas cópias (Kohli et al., 2006), a planta P 2193 apresentou um alto nível de expressão gênica, indicando que talvez somente as poucas cópias confirmadas nas gerações seguintes estivessem íntegras. Estudos têm correlacionado esse fato com

o número de cópias do transgene, e alguns demonstram que múltiplas cópias do transgene podem induzir a níveis maiores do transcrito quando comparados com um evento com uma cópia do transgene homólogo (Kohli et al., 2006). Quanto aos outros eventos de soja positivos gerados e quantificados, na geração T_0 , os valores de cópias inseridas do transgene *AtDREB2A CA* variaram de 2 a 15. Este fato mais uma vez, corrobora a premissa de que os eventos transgênicos são independentes e que as inserções ocorrem ao acaso no genoma receptor.

Após a transformação, quando o transgene é inserido e integrado com sucesso, as plantas positivas podem transferi-lo para as gerações futuras. Quando este transgene não está ligado a outros genes, eles respondem de acordo com a 1ª Lei de Mendel, que prediz que um gene com dois alelos segrega de maneira independente, portanto, os seus descendentes na geração F_2 segregam na proporção de 3:1. Como o evento T_0 (primeira geração do transgene), é hemizigoto calcula-se que as sementes em T_1 geradas desse evento (semelhante a F_2) resultem da proporção esperada da geração Mendeliana F_2 . As plantas geradas da geração T_2 respondem com a proporção esperada da geração F_3 . Assim, como os resultados de Rech et al., (2008), a planta transformada P 2193, nas gerações T_0 e T_1 , obedeceu a 1ª Lei de Mendel, como observado pelos dados de PCR nas plantas testadas.

A análise de PCR realizada nas plantas DREB2A positivas P 1397 e P 2193 indicou que elas não são quimeras, fato que pode ocorrer quando algumas células vegetais são transformadas e outras não. Esse processo de quimerização pode ser diminuído quando se realiza a seleção de plantas transformadas utilizando-se a molécula de imazapir, herbicida da classe das imidazolinonas capaz de se translocar e se concentrar na região meristemática apical dos eixos embrionários, impedindo o desenvolvimento de células que não foram transformadas (Rech et al., 2008). Em nosso trabalho utilizamos a co-transformação do transgene *AtDREB2A CA* com o gene *AHAS* mutante, que transcreve uma enzima funcional que degrada a herbicida imazapir, usada como molécula seletiva no processo de transformação. A utilização desta metodologia de seleção de embriões transformados otimiza o processo de transformação e reduz escapes (Rech et al., 2008).

As análises de expressão gênica relativa realizadas nos eventos GMs P 1397 e P 2193 nas gerações T_0 , T_1 e T_2 (apenas na P 2193), submetidos à desidratação celular e hidroponia (geração T_2) indicaram que o transgene foi inserido

em uma região de expressão, ou seja, que foi reconhecido pela maquinaria enzimática da célula resultando na sua inserção e expressão corretas, e ainda que, a sua introdução foi provavelmente em regiões com eucromatina, onde não ocorreu metilação e/ou silenciamento do transgene (Kohli et al., 2006).

Os resultados de expressão do transgene *AtDREB2A CA* nos primeiros tempos do experimento de desidratação celular na geração T₀ sugerem que o transgene ao expressar um fator de transcrição pode ativar vários genes da cascata de resposta à desidratação em condições de déficit hídrico, elevando a expressão destes e conseqüentemente as respostas defensivas vegetais ao estresse ambiental imposto (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006). No entanto, neste trabalho a expressão de tais genes *downstream* induzidos pelo DREB2A não foi quantificada, sendo esta uma etapa proposta para o futuro próximo.

O transgene *AtDREB2A CA* inserido nas plantas de soja teve sua expressão induzida pelo promotor estresse induzido *rd29A*, gene atuante na transdução de sinais nas vias dependente e independente de ABA, como visto pelos valores de expressão da geração T₀ no evento P 1397 nos T30 e T90 min de 142,105 e 36,96 ($p > 0,001$ e $P > 0,038$), respectivamente e pelo valor de expressão do transgene quantificado em raízes do evento P 2193 no T60 min, indicando uma expressão de 30,301 ($p > 0,003$). O gene *rd29A* foi caracterizado por Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki (1993) quando estudaram sua transcrição em condições de déficit hídrico e, observaram que, além da resposta lenta, mediada por ABA, o gene respondia rapidamente à seca, sugerindo outra rota de transdução de sinais. Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki (1994) encontraram ainda na região promotora deste gene, a seqüência DRE, na qual os fatores de transcrição DREBs se ligam.

Em trabalhos de transformação com *Arabidopsis thaliana* (Quist et al., 2009), *Brassica napus* (Dalal et al., 2009), *Arachis hypogaea* L. (Bhatnagar-Mathur et al., 2007) e *Glycine max* L. Merrill (Beneventi, 2006) foram utilizados cassetes de expressão contendo o promotor estresse induzido *rd29A*, para regulação e expressão de genes em condições específicas de estresse. No trabalho realizado por Beneventi (2006), o transgene *AtDREB1A* foi expressou 20.000 vezes no tratamento de T 90 min de desidratação celular na geração T₀ e aproximadamente 13.000 na geração T₁ resultando em umaumento da tolerância das plantas de soja, à condições de déficit hídrico.

Como demonstrado pelos valores acima de expressão diferenciada,

os dois eventos expressaram o transgene inserido de maneiras diferentes sob condições de estresse hídrico, uma vez que, seus transgenes podem estar inseridos em locais de diferentes níveis de expressão gênica e ainda que o número de cópias inseridas no genoma pode não ser igual para as duas plantas.

Comparando-se a expressão na geração T_1 com a geração T_0 da planta transgênia P 1397, o nível de expressão gênica foi diminuído, apresentando repressão do transgene no tempo de T 30 min (0,353 $p > 0,454$) quando comparada com tempo controle do mesmo evento na geração T_1 . Não se sabe o porquê, mas alguns transgenes cessam sua expressão em gerações sucessivas, devido possivelmente a mudanças sutis na integração do transgene, provocando expressão imprevisível, associado a padrões de metilação do DNA alterado no transgene e ainda ao silenciamento gênico realizado pela maquinaria da célula receptora (Kohli et al., 2006).

Experimentos com folhas destacadas também foram realizados por Wu et al., (2008) em plantas transformadas com o gene *OsWRKY11*. Após um tratamento no qual as partes verdes foliares foram deixadas em contato com o ar, o conteúdo de água perdido foi mensurado e os dados correlacionados com o resultado de tolerância ao estresse térmico confirmados pela expressão aumentada do gene de 3x e 3,7x.

O experimento de hidroponia realizado na geração T_2 do evento P 2193 foi utilizado para quantificar o nível de expressão em raízes. Neste método, a raiz estressada não sofre danos mecânicos no momento de imposição do tratamento e principalmente no processo de obtenção de material biológico, uma vez que, elas não precisam ser retiradas do solo ou areia, evitando-se assim a expressão de genes de resposta ao estresse mecânico (Martins et al., 2008).

A escolha do estudo de raízes ocorre pelo fato que o promotor *rd29A* é mais expresso em raízes (Yamaguchi- Shinozaki e Shinozaki, 1994) e principalmente pelo fato da percepção do estresse hídrico ocorrer inicialmente neste órgão vegetal, uma vez que, por mais que as plantas possam absorver água por toda a sua superfície, a maior parte é absorvida pelas raízes, como observado em plantas superiores (Larcher, 2000).

A geração T_2 foi a escolhida para análise de expressão do transgene *AtDREB2A CA* em hidroponia porque supõe-se que o transgene é mais estável que nas gerações anteriores. Além disso, houve para a imposição deste tratamento, a

necessidade de um número maior de plantas positivas para a análise estatística correta. Alguns estudos na geração T₂ vêm sendo realizados com outros genes, não necessariamente fatores de transcrição, visando à obtenção de dados para o entendimento da resposta das plantas a condições adversas. Peng et al., (2007) estudaram em uma geração T₂ de *A. thaliana*, a superexpressão do gene *PgTIP1*, que transcreve uma aquaporina, resultando em uma planta transgênica mais tolerante a seca, a salinidade e ao calor.

Uma confirmação da expressão diferencial em órgãos vem do estudo realizado por Zhu et al., (2009) que demonstraram que, assim como na geração T₂ da P 2193, um transgene inserido pode se expressar de maneira diferente em diversos órgãos da planta. Estes autores inseriram em arroz um gene que codifica o microRNA miT172 de arroz, regulador da expressão de genes ligantes ao AP2 – atuantes no desenvolvimento floral em arroz (*Os07g13170*) e observaram que o transgene superexpresso silenciou o gene *Os07g13170* e outros genes da sua família, sendo portanto reprimidos, indicando que nas partes da planta onde havia mais microRNA havia menos desses transcritos. Também com relação à expressão gênica em diferentes estádios, este estudo demonstrou que o gene *Os07g13170* é mais altamente expresso em estádios vegetativos tardios e em panículas (Zhu et al., 2009).

Neste enfoque, os valores maiores de expressão do transgene *AtDREB2A CA* detectado em raízes quando comparados com os valores obtidos em folhas no evento P 2193 (no experimento de desidratação celular e hidroponia) são corroborados por estudos com genes homólogos de *DREB2A* que também apresentaram maior expressão do transgene em raízes (utilizando o promotor constitutivo 35S), como demonstrado por Qin et al., (2007) em milho e Liu et al., (1998) em *A. thaliana*. Assim como os valores de expressão gênica em relação aos órgãos são maiores nas raízes (T60 min – 30,301 e p>0,003) em condições de deficiência hídrica, o transgene nos tempos de tratamento também expressa mais quando comparados com o T0 min, segundo dados observados nos eventos P 1397 e P 2193.

Segundo a literatura científica, os fatores de transcrição podem apresentar padrão de expressão gênica em altos níveis como observado no trabalho de Wu et al., (2009) que inseriram o fator de transcrição *OsWRKY11* ligado ao promotor HSP101 na cultivar de arroz. Este trabalho mostrou que o gene também foi

expresso em altos níveis, em condições de déficit hídrico. Wu et al., (2009) realizaram ainda, em plantas transgênicas da geração T₁ de um evento positivo para esta construção, um pré-tratamento térmico e os resultados mostraram menor murcha foliar e alta taxa de sobrevivência das partes verdes, com significativa a tolerância a seca e ao calor. Esses resultados somados aos dados da expressão do transgene *OsWRKY11* de 3,7x e 3x mais corroboram a indução desse gene no tratamento térmico aplicado (Wu et al., 2008). Assim, pode-se sugerir que a inserção e a expressão do transgene *AtDREB2A* no evento de soja P 2193 poderia aumentar a tolerância a seca dessas plantas, dados comprovados pelos menores valores de taxa transpiração e diferença da temperatura do ambiente com a foliar na planta transgênica (4,05; 0,53) quando comparada com a planta controle BR16 (8,26; 2,79) no T 30 min de estresse.

Nos dois eventos de soja GMs aqui estudados, o transgene *AtDREB2A CA* provavelmente iniciou a percepção do estresse aplicado no tempo de T 30 min, apresentando um grande aumento de expressão aos T 60 min na raiz, seguidos da expressão na folha. Esta resposta do transgene *AtDREB2A CA* é necessária uma vez que, como fator de transcrição, o gene atua de maneira indireta na manutenção celular durante o estresse hídrico por desencadear genes de proteção de estruturas celulares contra a desidratação. Pesquisas como a de Zhong et al., (2008) demonstram que os fatores de transcrição podem ser induzidos em condições específicas como o tempo de tratamento de estresse.

Os valores de expressão gênica detectados no evento transgênico P 2193 quando comparados com a planta controle BR 16, demonstraram que o transgene está sendo expresso em todos os tempos de tratamento, fato que sugere que esteja havendo expressão basal do mesmo, já que no T0 min do experimento de desidratação celular na geração T₁ (11x p>0,072 na P 1397 e 111x p>0,081 na P 2193) e no experimento de hidroponia nas folhas (121,72x p>0,001) e raízes (901,272x p>0,001) o transgene *AtDREB2A CA* foi expresso nas plantas GMs. Trabalhos mostram que promotores constitutivos apresentam resultados semelhantes, uma vez que, induzem a expressão do transgene em todos os momentos. Um exemplo disso foi observado no trabalho de Zang et al., (2010) que demonstraram altos níveis de expressão de até 400x do gene estudado que codifica um micro RNA. Zhong et al., (2008) também quantificaram em plantas transgênicas de arroz a superexpressão de um fator de transcrição SND que atua na biossíntese

da parede secundária e, obtiveram valores de até $15 (x10^6)$ mais expresso.

Apesar do transgene *AtDREB2A CA* estar sendo expresso no T0 min das plantas P 1397 e P 2193, a sua expressão é menor que nos demais tempos de tratamento. Uma explicação para esta expressão gênica detectada em todos os tempos de tratamento é a atuação de algum tipo de regulação, além da expressão basal dada pelo promotor *RD29A* já observada na expressão do gene *AtDREB2A* em *A. thaliana* (Sakuma et al., 2006b). Esse fato é confirmado pela altura normal observada nas plantas GMs, o que não acontece quando um inserto é transcrito a todo momento, quando sob expressão basal ou controle de um promotor constitutivo, como demonstrado nas pesquisas de Liu et al., (1998), Yoshida et al., (2008), Sakuma et al., (2006b) que superexpressaram um gene e as plantas não apresentaram um crescimento normal, tornando-se anãs.

5 CONCLUSÕES

- O protocolo de transferência gênica via biobalística se mostrou eficiente (1,19%) na obtenção de PGMs de soja contendo a construção *rd29A:AtDREB2A CA*;
- O transgene *AtDREB2A*, isolado de *A. thaliana* foi inserido com sucesso em plantas de soja;
- A variação no número de cópias inseridas em cada evento gerado provou a independência de cada evento gerado;
- Os resultados dos experimentos de déficit hídrico provaram a provável indução da transcrição do gene *AtDREB2A* pelo promotor estresse induzido *rd29A* em condições de seca;
- Novos estudos devem ser realizados visando à obtenção de maiores informações quanto a um possível aumento da tolerância a condições de estresse hídrico nas plantas de soja GMs.

REFERÊNCIAS

ABIOVE – Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais – Disponível no site <<http://www.abiove.com.br>> Acesso em abril de 2010.

AGARWAL, P.; AGARWAL, P.K.; NAIR, S.; SOPORY, S.K.; REDDY, M.K. Stress-inducible DREB2A transcription factor from *Pennisetum glaucum* is a phosphoprotein and phosphorylation negatively regulates its DNA-binding activity. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 277, p. 189-98, 2007.

AGÊNCIA CT- Mudança de clima- Aquecimento ameaça agricultura. Fonte: O Estado de São Paulo. 2005.

AKASHI, K.; MIYAKE, C.; YOKOTA, A. Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild water melon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. **FEBS Letters**, v. 508, p. 438–442, 2001.

ALMOGUEVA, C.; PRIETO-DAPENA, P.; DIAZ-MARTÍN, J.; ESPINOSA, J.M., CARRANCO, R.; JORDANO, J. The *HaDREB2* transcription factor enhances basal thermotolerance and longevity of seeds through functional interaction with HaHSFA9. **BMC Plant Biology**, v.9, p. 1-12, 2009.

ANBIO - Associação Nacional de Biossegurança - Disponível no site <<http://www.anbio.org.br>>, 2006.

ARAGÃO, F.J.L. Development of transformation methods toward producing transgenic plants with abiotic stress tolerance. **JIRCAS Working Report**, p.35-42. 2002.

BAKER, J.; STEELE, C.; DURE, L.I.I.I. Sequence e characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. **Plant Molecular Biology**, v. 11, p. 277-291, 1988.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Plant Science**, v. 24, p. 23-58, 2005.

BEEVER, D. Os transgênicos e o futuro da agricultura. **Biotecnologia e Desenvolvimento**, v. 15, p. 4-7, 2000.

BEHNAM, B.; KIKUCHI, A.; CELEBI-TOPRAK, F.; YAMANAKA, S.; KASUGA, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; WATANABE, K.N. The *Arabidopsis* DREB1A gene driven by the stress-inducible rd29A promoter increases salt-stress tolerance in proportion to its copy number in tetrasomic tetraploid potato (*Solanum tuberosum*). **Plant Biotechnology**, v. 23, p. 169–177, 2006.

BELIN, C.; THOMINE, S.; SCHROEDER, J.I. Water Balance and the Regulation of Stomatal Movements. **Abiotic Stress Adaptation in Plants**, part 3, p. 283-305, 2010.

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 a seca. 126 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

BHATIA, S.; SINGH, R. Phytohormone-mediated transformation of sugars to starch in relation to the activities of amylases, sucrose metabolising enzymes in sorghum grain. **Plant Growth Regulation**, v. 36, p. 97–104, 2002.

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 Report**, v. 26, p. 2071-2082, 2007.

BOKOR, M.; CSIZMOK, V.; KOVACS, D.; BANKI, P.; FRIEDRICH, P.; TOMPA, P.; TOMPA, K.N.M.R. NMR relaxation studies on the hydrate layer of intrinsically unstructured proteins. **Biophysical Journal**, v. 88, p. 2030-2037, 2005.

BONATO, E.R. E BONATO, A.L.V. A soja no Brasil: história e estatística. Londrina, EMBRAPA- Cnpso, 1987. 61p. (**EMBRAPA- Cnpso. Documentos, 21**).

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

BORÉM A. Cultivares e genes: entidades distintas e essenciais a agricultura. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 32, p. 61-63, 2004.

BRAVO, L.A.; GALLARDO, J.; NAVARRETE, A.; OLAVE, N.; MARTINEZ, J.; ALBERDI, M.; CLOSE, T.J.; CORCUERA, L.J. Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. **Physiologia Plantarum.**, v. 118, p. 262-269, 2003.

BRAY, E.A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**. 55: 2331-2341, 2004.

BULLEY, S.M.; RASSAM, M.; HOSER, D.; OTTO, W.; SCHÜNEMANN, N.; WRIGHT, M.; MACRAE, E.; GLEAVE, A.; LAING, W. Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in *Arabidopsis* indicates that GDP-L-galactose guanyltransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, No. 3, p. 765–778, 2009.

CARDULLO, R.A.; AGRAWAL, S.; FLORES, C.; ZAMECNIK, P.C.; WOLF, D.E. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 23, p. 8790–8794, 1988.

CARVALHO, M.H.C. Drought stress and reactive oxygen species. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, p. 156-165, 2008.

CHEN, M.; WANG, Q.Y.; CHENG, X.G.; XU, Z.S.; LI, L.C.; YE, X.G.; XIA, L.Q.; MA, Y.Z. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred droughty and high-salt tolerance in transgenic plants. **Plant Journal**, v. 12, p. 264-74, 2007.

CHINNUSAMY, V.; XIONG, L.; ZHU, J-K. Use of genetic engineering and molecular biology approaches for crop improvement for stress environments. **Abiotic Stresses: plant resistance through breeding and molecular approaches**, p. 47-107 2005.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível no site <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em abril de 2010.

CHRISTMANN, A.; HOFFMANN, T.; TEPLOVA, I.; GRILL, E.; MÜLLER, A. Generation of Active Pools of Abscisic Acid Revealed by In Vivo Imaging of Water-Stressed Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.137, p. 209-219, 2005.

DALAL, M.; TAYAL, D.; CHINNUSAMY, V.; BANSAL, K.C. Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance. **Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 137-45, 2009.

DEUSCHLE, K.; FUNCK, D.; HELLMANN, H.; DASCHNER, K.; BINDER, S.; FROMMER, W.B. A nuclear gene encoding mitochondrial delta-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. **Plant Journal**, v. 27, p. 345–356, 2001.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull**, v. 19, p. 11-15, 1987.

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

EGAWA, C.; KOBAYASHI, F.; ISHIBASHI, M.; NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.; TAKUMI, S. Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a DREB2 homolog under abiotic stress conditions in common wheat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 9, p. 299-305, 2006.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível no site <www.cnpso.embrapa.br> 2005.

EVANS, D.A.; SHARP, W.R. Applications of Somaclonal Variation. **Nature Biotechnology**, v. 4, p. 528-532, 1986.

FARIAS et al. Efeito da variação diária da umidade do solo sobre a fotossíntese e resistência estomática da soja. In Sociedade Brasileira Agrometeorologia, 9, ed, Anais. **Congresso Brasileiro de Agrometeorologia**, 9 Campina Grande, PB, pp 68-70, 1995.

FINER, J.J.; FINER, K.R.; SANTARÉM, E.R. Plant Cell Transformation, physical methods for. In: MEYERS, R.A. **Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine**. Weinheim: VCH Publishers, 1996.

FISK, H.J.; DANDEKAR, A.M. The introduction and expression of transgenes in plants. **Scientia Horticulturae**, v. 55, p. 5–36, 1993.

FLAVELL, R.B. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of

- specific sequence duplication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v., p. 3490-3496. 1994.
- FRANK, W.; MUNNIK, T.; KERKMANN, K.; SALAMINI, F.; BARTELS D. Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. **Plant Cell**, v. 12, p.111–23, 2000.
- FREDERICK, J.R.; ALM, D.M.; HESKETH, J.D. Leaf photosynthetic rates, stomatal resistances, and internal CO₂ concentrations of soybean cultivars under drought stress. **Photosynthetica**. 23: 575-584, 1989.
- FREEMAN, W.M.; WALKER, S.J.; VRANA, K.E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **BioTechniques** , v. 26, p. 112-115, 1999.
- FROMM, M.; TAYLOR, L.P.; WALBOT, V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. **Proceeding of National Academy of Science USA**, v. 82, p. 5824-5828, 1985.
- GALAU, G.A.; HUGHES, D.W.; DURE, L.I.I.I.. Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (LEA) mRNAs. **Plant Molecular Biology**, v. 7, p. 155–170, 1986.
- GIBSON, U.E.M., HEID, C.A., WILLIAMS, P.M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 995-1001, 1996.
- GILMOUR, S.J.; ZARKA, D.G.; STOCKINGER, E.J.; SLAZAR, M.P.; HOUGHTON, J.M.; TOMASHOW, 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**, v.16, p. 433-442, 1998.
- GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386-394, 2001.
- GONZALEZ-GUZMAN M.; ABIA D.; SALINAS; J.; SERRANO R.; RODRIGUEZ P.L. Two new alleles of the abscisic aldehyde oxidase 3 gene reveal its role in abscisic acid biosynthesis in seeds. **Plant Physiology**, v. 135, p. 325–333, 2004
- GOYAL, K.; WALTON, L.J.; TUNNAcliffe, A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. **Biochemical Journal**, v. 388, p. 151-157, 2005.
- DHEKNEY, S.A.; LI, Z.T.; ZIMMERMAN, T.W.; GRAY, D.J. Factors Influencing Genetic Transformation and Plant Regeneration of *Vitis*. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 60, p. 285-292, 2009.
- GRELET, J.; BENAMAR, A.; TEYSSIER, E.; AVELANGE-MACHEREL, M-H.; GRUNWALD, D.; MACHEREL, D. Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. **Plant Physiology**, v. 137, p.157-167, 2005.
- HAAKE, V.; COOK, D.; RIECHMANN, J.L.; PINEDA, O.; THOMASHOW, M.F.; ZHANG, J. Z.

- Transcription Factor CBF4 Is a Regulator of Drought Adaptation in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 130, p. 639-648, 2002,
- HARA, M.; TERASHIMA S.; KUBOI, T. Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from Citrus unshiu. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 1333-1339, 2001.
- HARTUNG, W.; SCHILLE, P.; DIETZ, K.J. The physiology of poikilohydric plants. **Progress in Botany**, v. 59, p. 299–327, 1998.
- HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU, J.K.; BOHNERT, H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 463–99, 2000.
- HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real Time Quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 986–994, 1996.
- HERNANDEZ-GARCIA, C. M.; MARTINELLI, A.P.; BOUCHARD, R.A.; FINER, J.J. A soybean (*Glycine max*) polyubiquitin promoter gives strong constitutive expression in transgenic soybean. **Plant Cell Reports**, v. 28, p. 837-849, 2009.
- HEWITT, E.J. Mineral nutrition of plants in culture media. **Plant Physiology**, In: Stewart FC (ed) Plant Physiology, p. 97-134, 1963.
- HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E.A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6. p. 431-438, 2001.
- HOLLAND, P.M.; ABRAMSON, R.D.; WATSON, R.; GELFAND, D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 7276-7280, 1991.
- HONJOH, K.; MATSUMOTO, H.; SHIMIZU, H.; OYAMA, K.; TANAKA, K.; ODA, Y.; TAKATA, R.; JOH, T.; SUGA, K.; MIYAMOTO, T.; ILO, M.; HATANO, S. Cryoprotective activities of group 3 late embryogenesis abundant proteins from *Chlorella vulgaris* C-27. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, p.1656-1663, 2000.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível no site <<http://www.mct.gov.br>>. Acesso em 2009.
- ISAAA – *International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications*. Disponível no site <http://www.isaaa.org>>. Acesso em 2010.
- ISAACSON, D.; KOSMA, D.K.; MATAS, A.J.; BUDA, G.J.; HE, Y.; YU, B.; PRAVITASARI, A.; BATTEAS, J.D.; STARK, R.E.; JENKS, M.A.; ROSE, J.K.C. Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. **The Plant Journal**, v. 60, p. 363-377, 2009.
- ITO, Y.; KATSURA, K.; MARUYAMA, K.; TAJI, T.; KOBAYASHI, M.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional Analysis of Rice

- DREB1/CBF-type Transcription Factors Involved in Cold-responsive Gene Expression in Transgenic Rice. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, p. 141–153, 2006.
- KARIOLA, T.; BRADER, G.; HELENIUS, E.; LI, J.; HEINO, P.; PALVA, E.T. Early responsive to dehydration 15, a negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 142, p. 1559-1573, 2006.
- 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**, v. 17, p. 287-291, 1999.
- 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 Cell Physiology**, v. 45(3), p. 346–350, 2004.
- KIYOSUE, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Characterization of a cDNA for a dehydration-inducible gene that encodes a Clp A, B-like protein in *Arabidopsis thaliana*. **Biochemistry Biophys.**, v. 196, p. 1214–1220, 1993.
- KOBAYASHI, F.; ISHIBASHI, M.; TAKUMI, S. Transcriptional activation of *Cor/Lea* genes and increase in abiotic stress tolerance through expression of a wheat DREB2 homolog in transgenic tobacco. **Transgenic Research**, v. 23, p. 755-767, 2007.
- KOHLI, A.; MELENDI, P.G; ABRANCHES, R.; CAPELL. T.; STOGER, E.; CHRISTOU, P. The quest to understand the basis and mechanisms that control expression of introduced transgenes in crop plants. **Plant Signaling e Behavior**, v. 1, p. 185-195, 2006.
- KOTAK, S.; VIERLING, E.; BÄUMLEIN, H.; VON KOSKULL-DÖRING, P. A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 19, p. 182-195, 2007.
- KOIWAI, H. ; NAKAMINAMI, K. ; SEO, M.; ,MITSUHASHI, W. ; TOYOMASU, T. ; KOSHIBA, T. Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1697–1707, 2004
- KOVACS, D.; KALMAR, E.; TOROK, Z.; TOMPA, P. Chaperone Activity of ERD10 and ERD14, Two. **Plant Physiology**, v. 147, 2008.
- KWAK, J.M.; NGUYEN, V.; SCHROEDER, J.L. The Role of Reactive Oxygen Species in Hormonal Responses. **Plant Physiology**, v. 141, p. 323-329, 2006.
- KYRIAKIS, J.M.; AYRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway activated by stress and inflammation. **Physiological Reviews**, v. 81, p. 807-869, 2001.
- LARCHER, W. *Ecofisiologia Vegetal*, São Carlos, São Paulo, RiMA Artes e Textos 2000.
- LEE, S.H.; AHSAN, N.; LEE, K.W.; KIM, D.H.; LEE, D.G.; KWAK, S.S.; KWON, S.Y.;

KIM, T.H.; LEE, B.H. Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1628-1638, 2007.

TANG, L.; KWON, S.Y.; KIM, S.H.; KIM, J.S.; CHOI, J.S.; CHO, K.Y.; SUNG, C.K.; KWAK, S.S.; LEE, H.S. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. **Plant Cells Reports**, v.25, p. 1380-1386, 2006.

LI, Z.; HANSEN, J.L.; LIU, Y.; ZEMETRA, R.; BERGER, P.H. Using real time PCR to determine transgene copy number in wheat. **Plant Molecular Biology Report**, v. 22, p. 179-188, 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. **Environment and Experimental Botany**, v. 47, p. 239-247, 2002.

LIN, C.; THOMASHOW, M.F. DNA sequence analysis of a complementary DNA for cold-regulated *Arabidopsis* gene *cor15* and characterization of the COR15 polypeptide. **Plant Physiology**, v. 99, p. 519-525, 1992.

LIU, F.; JENSEN, C.R.; SHAHANZARI, A.; ANDERSEN, M.N.; JACOBSEN, S.E. ABA regulated stomatal control and photosynthetic water use efficiency of potato (*Solanum tuberosum* L.) during progressive soil drying. **Plant Science**, v. 168, p. 831-836, 2005.

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

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOHMANN, C., EGGERS-SHUMACHER, G., WUNDERLICH, M. AND SCHÖFFL, F. Two different heat shock factors regulate immediate early expression of stress genes in *Arabidopsis*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 271, p. 11-21, 2004.

LORENZO, O.; CHICO, J.M.; SANCHEZ-SERRANO, J.J.; SOLANO, R. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 16, p. 1938-1950, 2004.

MAGOME, H., YAMAGUCHI, S., HANADA, A., KAMIYA, Y., ODA, K. *dwarf and delayed-flowering 1*, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. **Plant Journal**, v. 37, p. 720-729, 2004.

MANI, S., VAN, B.C.; VAN, M.M.; VERBRUGGEN, N. Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, 128, 73–83, 2002.

MARTINS, P.K.; JORDÃO, B.Q.; YAMANAKA, N.; FARIAS, J.R.B.; BENEVENTI, M.; BINNECK, E.; FUGANTI, R.; STOLF, R.; NEPOMUCENO, A.L. Differential gene expression and mitotic cell analysis of the drought tolerant soybean (*Glycine max* L. Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar MG/BR46(Conquista) under two water deficit induction systems. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 512-521, 2008.

MASON, G., PROVERO, P., VAIRA, M.A., ACOTTO, G.P. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. **BMC Biotechnology**, v.22, p. 1-10, 2002.

MATA, C.G.; LAMATTINA, L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1196–1204, 2001.

MCT- Ministério da Ciência e Tecnologia. 2005. Índice de investimentos em P&D com relação ao PIB de 2000-2005. Disponível no site <<http://www.mct.gov.br>>. Acesso em 2006.

MEI, C.; QI, M.; SHENG, G.; YANG, Y. Inducible Overexpression of a Rice Allene Oxide Synthase Gene Increases the Endogenous Jasmonic Acid Level, *PR* Gene Expression, and Host Resistance to Fungal Infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.29, No. 10, p. 1127-1137, 2006.

MOON, J.; PARRY, G.; ESTELLE, M. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. **Plant Cell**, v 16, p. 3181–3195, 2004

MUNNIK, T.; MEIJER, H.J.G. Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signaling pathways in plants. **FEBS Letters**, v. 498, p. 172–78, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plant**, v. 15, p. 473-497, 1962.

MURATA, Y.; PEI, Z-M.; MORI, I.C.; SCHROEDER, J. Abscisic acid activation of plasma membrane Ca^{2+} channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. **The Plant Cell**, v. 13, p. 2513-2523, 2001.

NAKASHIMA, K. YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular Studies on Stress-Responsive Gene Expression in *Arabidopsis* and Improvement of Stress Tolerance in Crop Plants by Regulon Biotechnology. **Jarq**, v. 39, p. 221-229, 2005.

NAKASHIMA, K.; KIYOSUE, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A nuclear gene encoding a chloroplast targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 12, p. 851–861, 1997.

- NELSON, D.E.; REPETTI, P.P.; ADAMS, T.R.; CREELMAN, R.A.; WARNER, J.W.D.C.; ANSTROM, D.C.; BENSON, R.J.; CASTIGLIONI, P.P.; DONNARUMMO, M.G.; HINCHEY, B.S.; KUMIMOTO, R.W.; MASZLE, D.R.; CANALES, R.D.; KROLIKOWSKI, K.S.; DOTSON, S.B.; GUTTERSON, N.; RATCLIFFE, O.J.; HEARD, J. E. Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 16450-16455, 2005.
- NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J.R.B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 23, p. 12-18, 2001.
- NEUHAUS, G. Introduction V: microinjection into plant cells: methodology and applications. **Gene transfer to plants**, p. 173-175, 1995.
- NISHIZAWA, A.; YABUTA, Y.; YOSHIDA, E.; MARUTA, T.; YOSHIMURA, K.; SHIGEOKA, S. Arabidopsis heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. **Plant J.**, v. 48, p. 535-547, 2006.
- NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Avaliação de Riscos Ambientais de Plantas Transgênicas. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v. 18, p. 81-116, 2001.
- OH, S.J.; KIM, Y.S.; KWON, C.W.; PARK, H.K.; JEONG, J.S.; KIM, J.K. Overexpression of the Transcription Factor AP37 in Rice Improves Grain Yield under Drought Conditions. **Plant Physiology**, v.150, p. 1368-1379, 2009.
- OKAMURO, J.K.; CASTER, B.; VILLARROEL, R.; VAN MONTAGU, M.; JOFUKO, K.D. The AP2 domain of APETALA defines a large and new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**. v 94, p 7076-7081, 1997.
- OYA, T. ; NEPOMUCENO, A.L. ; NEUMAIER, N. ; FARIAS, J.R.B. ; TOBITA, S. ; ITO, O. Drought tolerance characteristics of brazilian soybean cultivars. **Plant Production Science**, v. 7, p. 129-137, 2004.
- PELLEGRINESCHI, A.; RIBAUT, J.-M.; TRETOWAN, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; HOISINTONG, D. Progress in the genetic engineering of wheat for water-limited conditions. **JIRCAS Working Report**. p.55-60, 2002.
- PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DURÁ-VILA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, v. 104, p. 183- 191, 1995.
- PENG, Y.; LIN, W.; CAI, W.; ARORA, R. Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. **Planta**, v. 226, p. 729-740, 2007.
- PFAFFL, M.M.; HORGAN, G.W.; DEMPFFLE, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, no. 90, p. 1-10, 2002.

PIERIK, R.; SASIDHARAN, R.; VOESENEK, L.C.J. Growth Control by Ethylene: Adjusting Phenotypes to the Environment. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 26, p. 188-200, 2007.

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**. 125 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

POTRYKUS, I. Gene transfer to cereals: an assessment. **Biology Technology**, v. 8, p 535-542, 1990.

POUCHKINA-STANTCHEVA, N.N.; MCGEE, B.M.; BOSCHETTI, C.; TOLLETER, D.; CHAKRABORTEE, S.; POPOVA, A.V.; MEERSMAN, F.; MACHEREL, D.; HINCHA, D.K.; TUNNACLIFFE, A. Functional divergence of former alleles in an ancient asexual invertebrate. **Science**, v. 318, p. 268-271, 2007.

QIN, F.; KAKIMOTO, M.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; TRAN, L-S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. **The Plant Journal**. 50:54-69, 2007.

QIN, F.; SAKUMA, Y.; TRAN, L.S.P.; MARUYAMA, K.; KIDOKORO, S.; FUJITA, Y.; FUJITA, M.; UMEZAWA, T.; SAWANO, Y.; MIYAZONO, K.; TANOKURA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. *Arabidopsis* DREB2A-Interacting Proteins Function as RING E3 Ligases and Negatively Regulate Plant Drought Stress-Responsive Gene Expression. **The Plant Cell**, v. 20, p. 1693-1707, 2008.

QUIST, T.M.; SOKOLCHIK, I.; SHI, H.; JOLY, R.J.; BRESSAN, R.A.; MAGGIO, A.; NARSIMHAN, M.; LI, X. HOS3, an ELO-Like Gene, Inhibits Effects of ABA and Implicates a S-1-P/Ceramide Control System for Abiotic Stress Responses in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant**, v. 2, p. 138-151, 2009.

RAYBOULD, A.F.; GRAY, A.J. Genetically modified crops and hybridization with wild relatives: a UK perspective. **Journal of Applied Ecology**, v. 30, p. 199-219, 1993.

RECH, E.L.; VIANNA, G.R.; ARAGÃO, F.J.L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nature protocols**, v. 3. p. 410-418, 2008.

REST– *Relative Expression Software*. Disponível no site < <http://www.gene-quantification.de/rest-2008.html>>. Acesso em 2009.

REYES, J.L.; RODRIGO, M-J.; COLMENERO-FLORES, J.M.; GIL, J-V.; GARAY-ARROYO, A.; CAMPOS, F.; SALAMINI, F.; BARTELS. D.; COVARRUBIAS, A.A. Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects *in vitro*. **Plant Cell Environment**, v. 28, p. 709-718, 2005.

RIECHMANN, J.L.; MEYEROWITZ, E.M. The AP2/EREBP family of plant transcription factors. **Biological chemistry**, v. 6., p. 633-46, 1998.

- RIVERO, R.M.; KOJIMA, M.; GEPSTEIN, A.; SAKAKIBARAT, H.; MITTLER, R.; SHIMON, G.; BLUMWALD, E. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 19631-19636, 2007.
- RIZHSKY, L.; LIANG, H.; MITTLER, R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. **Plant Physiology**, v.130, p. 1143-1151, 2002.
- ROBINSON, M.; COBB, M.H. Mitogen-activated protein kinase pathways. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, p. 180-186, 1997
- ROLLA, A.A.P. **Desenvolvimento e validação de um método de determinação do número de cópias transgenes no genoma da soja por PCR quantitativo**. 75 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.
- RUIZ-LOZANO, J.M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. **Mycorrhiza**, v. 13, p. 309-317, 2003.
- SAKUMA, Y.; LIU, Q.; DUBOUZET, J.G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, p. 998–1009, 2002.
- SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; QIN, F.; OSAKABE, Y.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water- stress-responsive and heat-stress - responsive gene expression. **Plant Biology**, p. 1-6, 2006a.
- SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional Analysis of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A, involved in Drought-Responsive gene expression. **The Plant Cell**, v. 18, p. 1292-1309, 2006b.
- SALINET, L.H.; FARIAS, J.R.B.; OLIVEIRA, R.F.; NEPOMUCENO, A. L. Avaliação Fisiológica de soja geneticamente modificada visando tolerância à seca. Resumo apresentado no XICBFV - Gramado – RS. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, vol. 19, 2007.
- SANCHEZ-BALLESTA, M.T.; RODRIGO, M.J.; LAFUENTE, M.T.; GRANELL, A.; ZACARIAS L. Dehydrin from Citrus, which confers in vitro dehydration tolerance and freezing protection activity, is constitutive and highly expressed in the flavedo of fruit but responsive to cold and water stress in leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1950-1957, 2004.
- SANFORD, J.C.; KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Journal of Particulate Science and Technology**, v. 5, p. 27-30, 1987.
- SANTARÉM, E. R. Métodos eficientes para transformação genética de plantas.

Revista Ciência e Tecnologia, v. 15, p. 81-90, 2000.

SANTOS, H.; DA COSTA, M.S. Organic solutes from thermophiles and hyperthermophiles. **Methods in Enzymology**, v. 334, p. 302–315, 2001.

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

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

SCHLÄPPI, M.; HOHN, B. Competence of immature maize embryos for Agrobacterium - mediated gene transfer. **Plant Cell**, v. 4, p. 7–16, 1992.

SCHRAMM, F.; GANGULI, A.; KIEHLMANN, E.; ENGLICH, G.; WALCH, D.; VON KOSKULL-DÖRING, P. The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, v. 60, p. 759-772, 2006.

SCHRAMM, F.; LARKINDALE, J.; KIEHLMANN, E.; ENGLICH, G.; VIERTLING, E.; PASCAL, VON K-D. A cascade of transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 53, p. 264-274, 2008.

SCOTT, B.J.; FISCHER, J.A. Comparing selection strategies for tolerance of acid soils. In: **A Workshop on Adaptation of to Soil Stress**, v. 1-4, p. 103-116, 1993.

SEO, M.; PEETERS, A.J.; KOIWAI, H.; ORITANI, T.; MARION-POLL, A.; ZEEVAART, J.A.; KOORNNEEF, M.; KAMIYA, Y.; KOSHIBA, T. The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 12908–12911, 2000.

SHAO, H.B.; CHU, L.Y.; LU, Z.H.; KANG, C.M. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. **International Journal of Biological Sciences**, v.1, p. 8-14, 2008.

SHIH, M.; LIN, S.; HSIEH, J.; TSOU, C.; CHOW, T.; LIN, T.; HSING, Y. Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max* L.) LEA protein, GmPM16. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 689-703, 2004.

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

SHINWARI, Z.K.; NAKASHIMA, K.; MIURA, S.; KASUGA, M.; SEKI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. An Arabidopsis gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 250, p. 161–170, 1998.

SNEDDEN, W.A.; FROMM, H. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants, **New Phytologist**, v.151, p. 35-66, 2001.

SOUTHERN, E. M. An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. **Anal Biochem.**, vol. 34, p. 317-318, 1974.

SOUTHGATE, E. M.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B.; WESTCOTT, R. J. A comparison of methods for direct gene transfer into maize (*Zea mays* L.). **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant**, v, 34, p. 218–224, 1998.

STOKSTAD, E. States sue over global warming. **Science**, 305:590, 2004.

STONE, S. L.; HAUKSDOTTIR, H.; TROY, A.; HERSCHLEB, J.; KRAFT, E.; CALLIS, J. Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of Arabidopsis. **Plant Physiology**. 137: 13–30, 2005.

STRYER, L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic roler. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 47, p. 819-846, 1978.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3º edição. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TERASHIMA, A.; TAKUMI, S. Allopolyploidization reduces alternative splicing efficiency for transcripts of the wheat DREB2 homolog, WDREB2. **Genome.**, v. 52, p. 100–105, 2009.

TOMPA, P.; BANKI, P.; BOKOR, M.; KAMASA, P.; KOVACS, D.; LASANDA, G.; TOMPA, K. Protein-water and protein-buffer interactions in the aqueous solution of an intrinsically unstructured plant dehydrin: NMR intensity and DSC aspects. **Biophys Journal**, v. 91, p. 2243-2249, 2006.

TRIESMAN, R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, p. 205-215, 1996.

TUTEJA, N. Abscisic Acid and Abiotic Stress Signaling. **Plant Signaling & Behavior**. Review, v. 2:3, p. 135-138, 2007.

ÚBEDA, F.; HAIG, D. On the evolutionary stability of mendelian segregation. **Genetics**, v. 170, p. 1345-1357, 2005.

UNO, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 11632-11637, 2000.

VALENTE, M.A.S.; SOARES-RAMOS, J.R.L.; REIS, P.A.B.; PINHEIRO, G.L.; MORAIS, A.T.; MENEZES, C.C.; CANO, M.A.O.; FIETTO, L.G.; LOUREIRO, M.E.; ARAGÃO, F.J. L.; FONTES, E.P.B. The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 533-546, 2008.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; ELMAYAN, T.; FEUERBACH, F.; GODON, C.; MOREL, J. B.; MOURRAIN, P.; PALAUQUI, J.C.; VERNHETTERS, S. Transgene-

induced gene silencing in plants. **Plant Journal**, v.16, p. 651-659, 1998.

WENDEHENNE, D.; PUGIN, A.; KLESSIG, D.F.; DURNER, J. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. **TRENDS in Plant Science**, v.6, p. 177-183, 2001.

WENG, H.; PAN, A.; ZHANG, C.; LIU, Z.; ZANG, D. Estimating Number of transgene copies in transgenic rapeseed by real-time PCR assay with *HMG I/Y* as an endogenous reference genes. **Plant Molecular Biology Report**, v. 22, p. 289-300, 2004.

WILKINSON, S.; WILLIAM J.D. Manipulation of the apoplastic pH of intact plants mimics stomatal and growth responses to water availability and microclimatic variation. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 619-631, 2008.

WISE, M.J.; TUNNAcliffe, A. POPP the question: what do LEA proteins do? **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 13-17, 2004.

WOLKERS, W.F.; MCCREADY, S.; BRANDT, W.F.; LINDSEY, G.G.; HOEKSTRA, F.A. Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses *in vitro*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1544, p.196-206, 2001.

WU, X.; SHIROTO, Y.; KISHITANI, S.; ITO, Y.; TONYAMA, K. Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. **Plant Cell Reports**, v.28, p. 21-30, 2009.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. **Plant Cell**, v. 6, p. 251–264, 1994.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Arabidopsis DNA Encoding Two Desiccation-Responsive rd29 Genes. **Plant Physiology**, v. 101, p. 1119-1120, 1993.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 781-803, 2006.

YOSHIDA, T.; SAKUMA, Y.; TODAKA, D.; MARUYAMA, K.; QIN, F.; MIZOU, J.; KIDORO, S.; FUJITA, Y.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of an Arabidopsis heat-shock transcription factor HsfA3 in the transcriptional cascade downstream of the DREB2A stress-regulatory system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 368, p.515–521, 2008.

ZANG, A.; XU, X.; NEILL, S.; CAI, W. Overexpression of OsRAN2 in rice and Arabidopsis renders transgenic plants hypersensitive to salinity and osmotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, No. 3, p. 777–789, 2010.

ZHONG, R.; LEE, C.; ZHOU, J.; MCCARTHY, R.L.; YE, Z.H. A Battery of Transcription Factors Involved in the Regulation of Secondary Cell Wall Biosynthesis in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 20, p. 2763-2782.

ZHOU, G.Y.; WENG, Y.S.; HUANG, J.G.; QIAN, S.Y.; LIU, G.L. Introduction of 6 exogenous DNA into cotton embryos. **Methods in enzymology**, p, 433-481, 1983

ZHU, Q.H.; UPADHYAYA, N.U.; GUBLER, F.; HELLIWELL, C.A. Over-expression of miR172 causes loss of spikelet determinacy and floral organ abnormalities in rice (*Oryza sativa*). **BMC Plant Biology**, v. 9, p. 149, 2009.

ANEXOS

ANEXO A

Figuras

Figura 12 - Modelo esquemático do plasmídeo pBluescript II SK que após digerido gerou o inserto (promotor RD29A + *DREB2A* 136-165 + terminador NOS) usado na transformação.

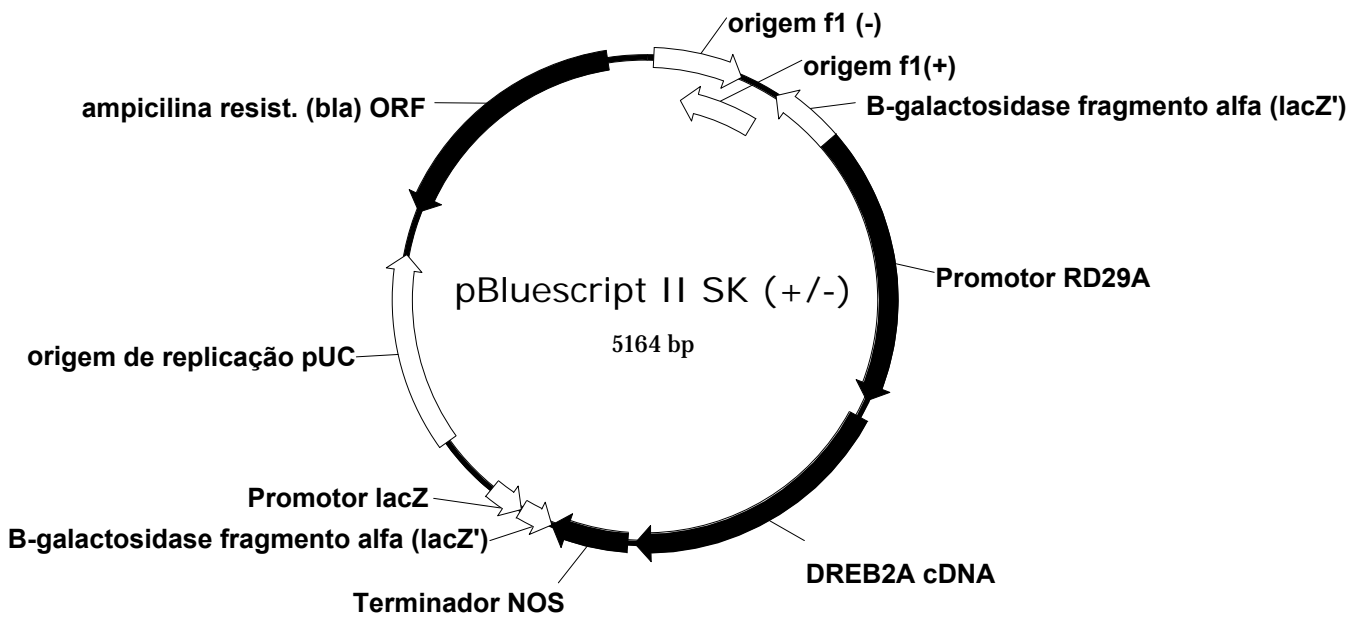


Figura 13 - Modelo esquemático do plasmídeo pAC321 contendo a sequência o gene *AHAS* (promotor/ *Ahas* 5'UTR + *Ahas* CDS + *Ahas* 3'UTR) de *Arabidopsis thaliana*, que após digerida foi usada na transformação.

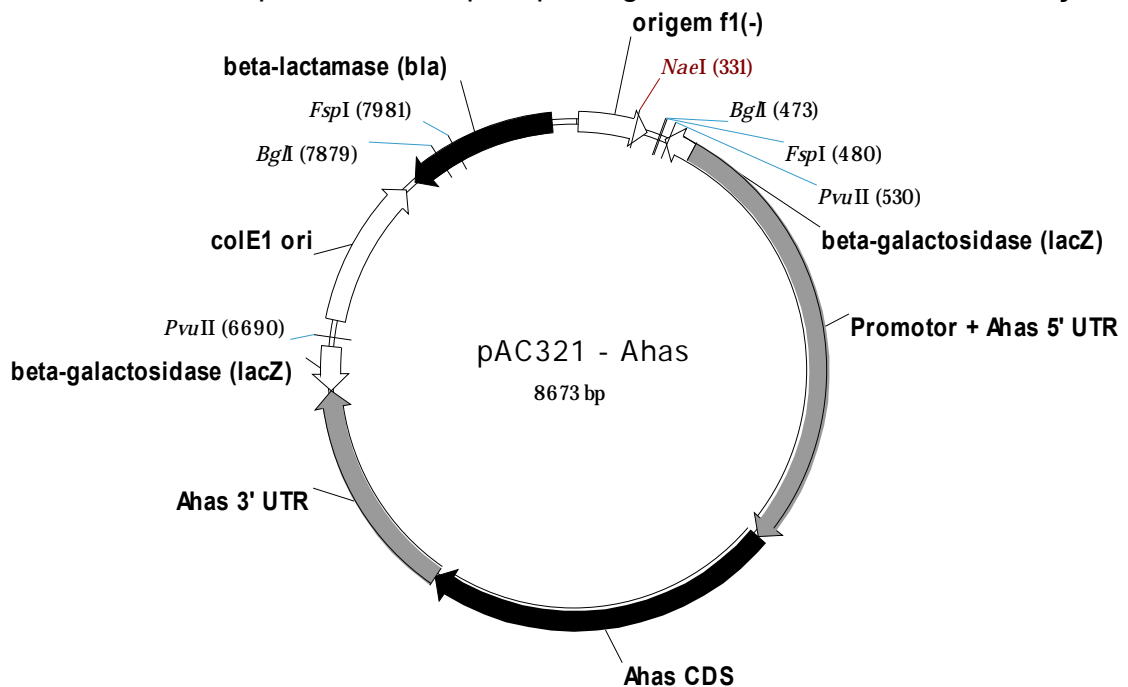


Figura 14 - *Gene gun* utilizado no bombardeamento dos embriões de soja BR16, com as construções contendo o gene *AtDREB2A* e *AHAS*, com todos os materiais utilizados durante o processo.

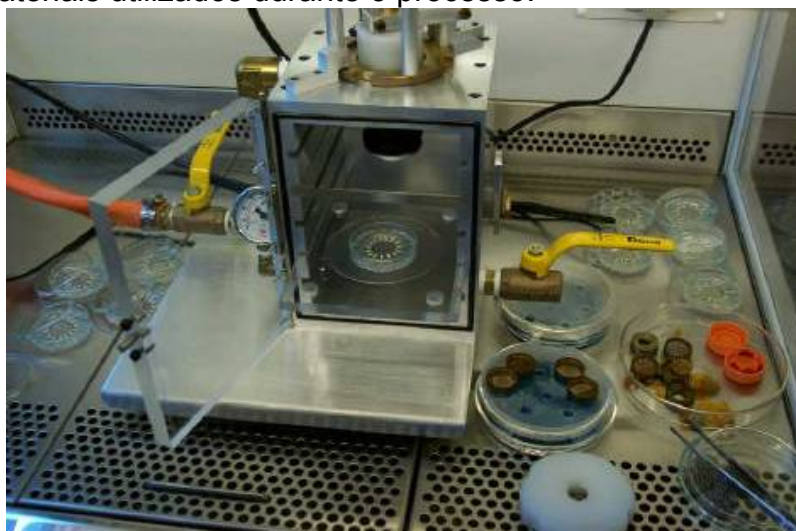


Figura 15 - **A** Copos com meio BAP onde os embriões se recuperavam após o processo de transformação. **B** Copos em areia:vermiculita em processo de aclimação.



Figura 16 - A Exemplo de plantas *AtDREB2A* positivas. **B** Sementes T₁ dos eventos P 1397 e P 2193.

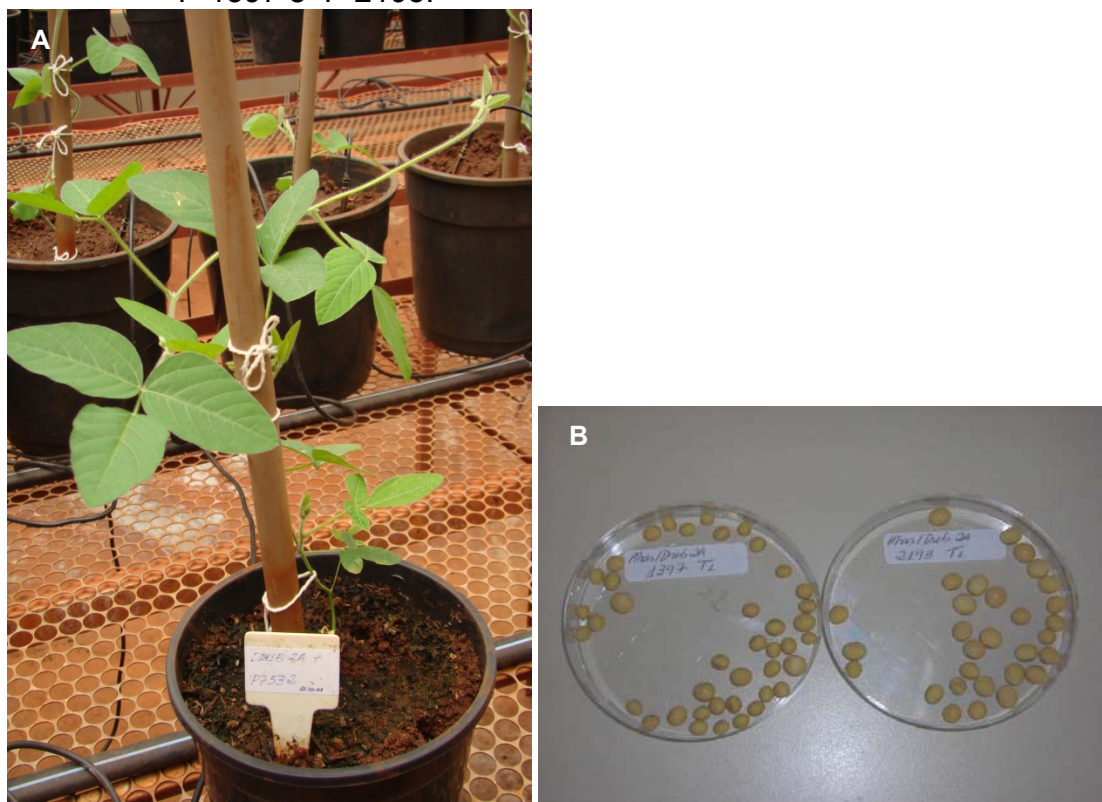


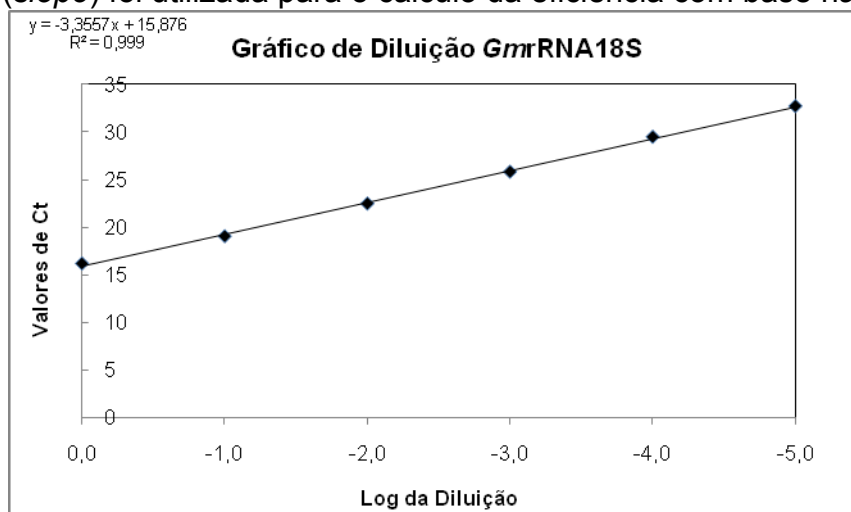
Figura 17 - Experimento de desidratação celular com amostras de folha dos eventos GM P1397 e P2193 realizado em câmara climatizada: as amostras T 30 min e T 90 min foram submetidas à desidratação celular a 30°C e 59% umidade.



Figura 18 - Evento P 2193 em crescimento no sistema hidropônico, **A** Plântulas de soja com três dias de crescimento, **B** Raízes de plantas de soja com 13 dias de crescimento e Folhas e raízes de soja com 13 dias.



Figura 19 - Curva de diluição utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação do gene *GmrRNA18S*. A amostra de cDNA do evento P 1397 foi diluída serialmente e amplificada em sistema *singleplex*. A inclinação da reta (*slope*) foi utilizada para o cálculo da eficiência com base na fórmula



($E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$). A eficiência obtida foi utilizada na quantificação relativa do transgene *AtDREB2A* no Experimento de Desidratação Celular geração T_0 .

Figura 20 - Curva de diluição utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação do transgene *AtDREB2A*, *primers* e sonda separados. A amostra de cDNA do evento P 1397 foi diluída serialmente e amplificada em sistema *singleplex*. A inclinação da reta (*slope*) foi utilizada para o cálculo da eficiência com base na fórmula ($E=10^{-1/slope} - 1$). A eficiência obtida foi utilizada na quantificação relativa do transgene *AtDREB2A* no Experimento de Desidratação Celular geração T₀.

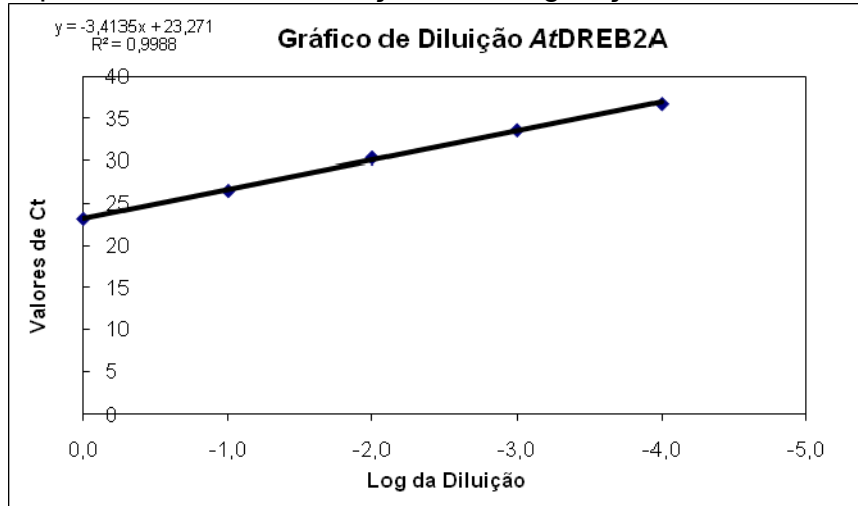


Figura 21 - Curva de diluição utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação do gene β _actina, *primers* e sonda separados. A amostra de cDNA do evento P 2193 foi diluída serialmente e amplificada em sistema *singleplex*. A inclinação da reta (*slope*) foi utilizada para o cálculo da eficiência com base na fórmula ($E=10^{-1/slope} - 1$). A eficiência obtida foi utilizada na quantificação relativa do transgene *AtDREB2A* no Experimento de Desidratação Celular geração T₁ e na Hidroponia.

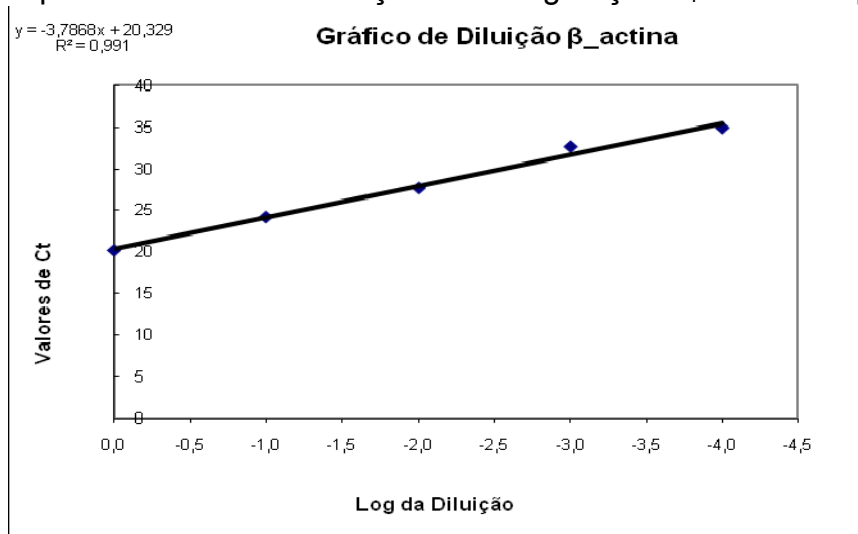


Figura 22 - Curva de diluição utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação do transgene *GmrRNA18S*, primers e sonda separados. A amostra de cDNA do evento P 2193 foi diluída serialmente e amplificada em sistema *multiplex*. A inclinação da reta (*slope*) foi utilizada para o cálculo da eficiência com base na fórmula ($E=10^{-1/slope} - 1$). A eficiência obtida foi utilizada na quantificação relativa do transgene *AtDREB2A* no Experimento de Desidratação Celular geração T₁ e na Hidroponia.

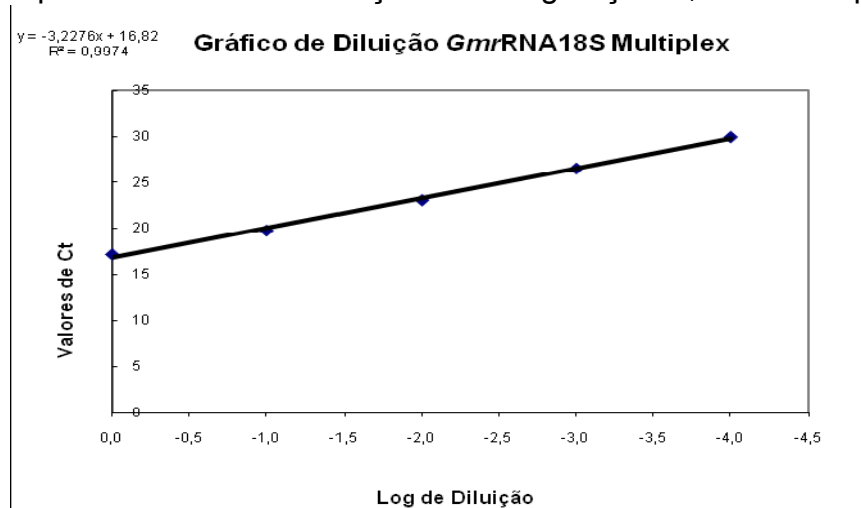


Figura 23 - Curva de diluição utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação do transgene *AtDREB2A* (*assay*). A amostra de cDNA do evento P 2193 foi diluída serialmente e amplificada em sistema *multiplex*. A inclinação da reta (*slope*) foi utilizada para o cálculo da eficiência com base na fórmula ($E=10^{-1/slope} - 1$). A eficiência obtida foi utilizada na quantificação relativa do transgene *AtDREB2A* no Experimento de Desidratação Celular geração T₁ e na Hidroponia.

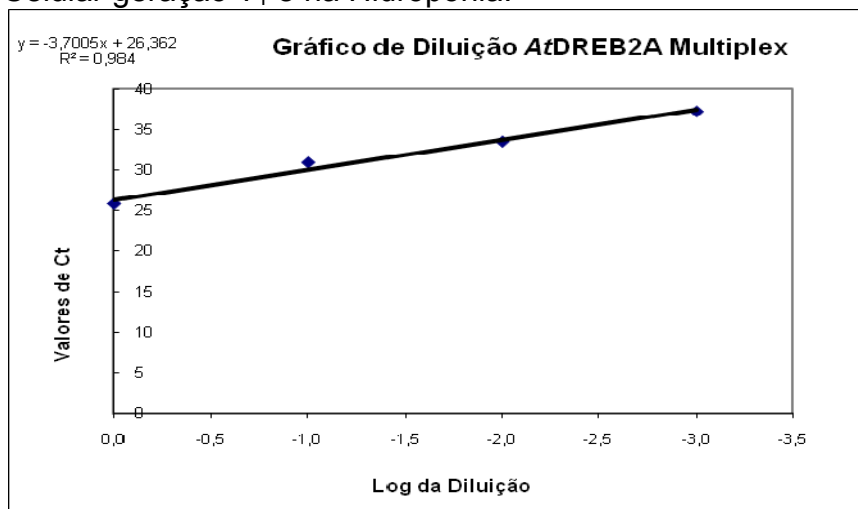


Figura 24 - Curva de diluição utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação do transgene *AtDREB2A* (assay). A amostra de DNA do evento P 1397 foi diluída serialmente e amplificada em sistema *multiplex*. A inclinação da reta (*slope*) foi utilizada para o cálculo da eficiência com base na fórmula ($E=10^{-1/slope} - 1$). A eficiência obtida foi utilizada na quantificação relativa do número de cópias do transgene.

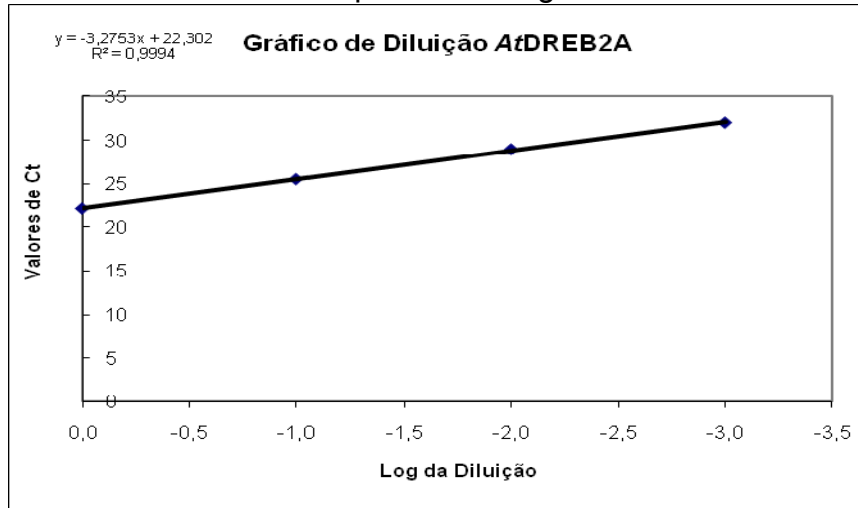
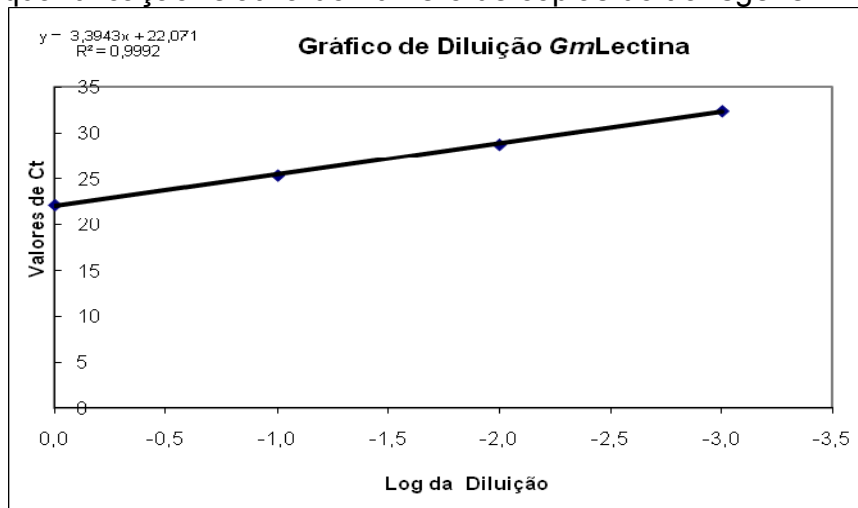


Figura 25 - Curva de diluição utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação do gene referência *Lectina* (*GmLec*). A amostra de DNA do evento P 1397 foi diluída serialmente e amplificado em sistema *multiplex*. A inclinação da reta (*slope*) foi utilizada para o cálculo da eficiência com base na fórmula ($E=10^{-1/slope} - 1$). A eficiência obtida foi utilizada na quantificação relativa do número de cópias do transgene



ANEXO B

Tabelas

Tabela 9 - Interação entre o tempo de estresse e as cultivares para a Taxa Fotossintética.

Tempo (min)	BR16			P 2193		
0	18,37	a	A	21,09	a	A
30	16,3	b	A	2,64	b	B
60	-0,41	c	B	-0,75	c	C
90	-1,44	c	B	-1,59	c	C

*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ($p=0,05$).

Tabela 10 -Interação entre o tempo de estresse e as cultivares para Condutância Estomática.

Tempo (min)	BR16			P 2193		
0	0,67	a	A	0,69	a	A
30	0,48	b	B	0,14	b	B
60	0,03	c	C	0,03	c	C
90	0,03	c	C	0,02	c	C

*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ($p=0,05$).

Tabela 11 -Interação entre o tempo de estresse e as cultivares para a Taxa de Transpiração.

Tempo (min)	BR16			P 2193		
0	9,07	a	A	10,13	a	A
30	8,26	a	A	4,05	b	B
60	0,99	b	B	0,83	c	C
90	-0,15	c	B	-0,54	d	C

*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ($p=0,05$).

Tabela 12 -Interação entre o tempo de estresse e as cultivares para a Diferença Ambiental e Foliar.

Tempo (min)	BR16			P 2193		
0	2,99	a	A	3,14	a	A
30	2,79	a	A	0,53	b	B
60	-1,21	b	B	-1,32	c	C
90	-1,47	b	B	-1,39	c	C

*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ($p=0,05$).